



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月23日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-251981

出 願 人

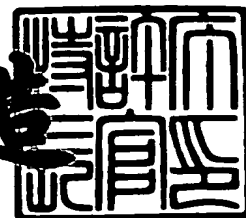
Applicant(s):

寶酒造株式会社

2001年 9月10日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3083106

【書類名】 特許願  
【整理番号】 T-1542  
【提出日】 平成12年 8月23日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12Q 1/68  
C12N 15/10

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 向井 博之

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 山本 純子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 友野 潤

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 小林 英二

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 榎 竜嗣

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 上森 隆司

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸配列増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含し、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法。

【請求項2】 (b)工程と(c)工程が連続的に反復される請求項1記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項3】 少なくとも2種類のプライマーを使用する、標的核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型

に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（b）工程に再度利用される工程；

（d）（c）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（a）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも1種のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（a）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

（e）（d）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（f）（e）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（e）工程に再度利用される工程；

を包含し、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法。

【請求項4】 標的核酸を増幅するための方法において、

（a）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（b）反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含し、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 5】 さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することを特徴とする請求項 4 に記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6】 標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域が 2 0 0 b p 以下であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 7】 下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることを特徴とする請求項 1 ～ 6 いずれか 1 項に記載の標的核酸の増幅方法。

一般式：5' - d N a - N b - d N c - 3'

(a : 1 以上以上の整数、b : 1 以上の整数、c : 0 または 1 以上の整数、d N : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、d N a の部位の一部の d N は N で置換されていてもよい)

【請求項 8】 c が 0 である請求項 7 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 9】 デオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが (α-S) リボヌクレオチドである請求項 7 又は 8 に記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 1 0】 請求項 7 ～ 9 いずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに適した DNA 伸長反応温度で DNA 伸長反応を行うことを特徴とする請求項 7 ～ 9 いずれか 1 項に記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 1 1】 鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、当該核酸と当該プライマーのアニーリングを増強する物質を含有するアニーリング溶液中でアニーリングさせる工程を包含することを特徴とする請求項 1 ～ 1 0 いずれか 1 項に記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 1 2】 スペルミジン及び／又はプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液が使用される請求項 1 1 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 1 3】 アニーリング処理が、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列

に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有するアニーリング溶液を90℃以上で保温した後、増幅反応が実施される温度以下に冷却して行われることを特徴とする請求項11又は12記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項14】 ビシン、およびヘスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で増幅反応が実施されることを特徴とする請求項1～13いずれか1項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項15】 DNAポリメラーゼが鎖置換活性を有する少なくとも1種のDNAポリメラーゼである請求項1～14のいずれか1項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項16】 DNAポリメラーゼとして、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが使用される請求項15記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項17】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項1～16のいずれか1項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項18】 エンドリボヌクレアーゼがRNase Hである請求項17記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項19】 DNAポリメラーゼとエンドヌクレアーゼがバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼと大腸菌由来RNase Hの組み合わせであることを特徴とする請求項1～18のいずれか1項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項20】 大腸菌由来RNase HがI型RNase Hである請求項19記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項21】 エンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼが使用される請求項1～14のいずれか1項に記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項22】 DNAポリメラーゼがバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼであり、当該Bc

a DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質の存在下に当該 B c a DNAポリメラーゼを使用する請求項 21 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 23】 B c a DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質がマンガンイオンである請求項 22 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 24】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質の存在下で増幅反応が実施される請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 25】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質がホスホノギ酸である請求項 24 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 26】 鋳型となる核酸が一本鎖または二本鎖の DNA である請求項 1～25 のいずれか 1 項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 27】 鋳型となる二本鎖 DNA を一本鎖 DNA にする工程の後に実施されることを特徴とする請求項 26 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 28】 鋳型となる核酸が RNA を鋳型とする逆転写反応によって得られた c DNA である請求項 26 または 27 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 29】 RNA を鋳型とする逆転写反応によって c DNA を合成する工程の後に実施されることを特徴とする請求項 28 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 30】 逆転写酵素として逆転写酵素活性を有する DNAポリメラーゼを使用することを特徴とする請求項 28 又は 29 に記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 31】 逆転写反応と鋳型に相補的な伸長鎖の合成とが、逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有する 1 種の DNAポリメラーゼにより実施されることを特徴とする請求項 28～30 のいずれか 1 項記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 32】 DNAポリメラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNAポリメラーゼ、もしくは、バチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項 31 記載の標的核酸の増幅方法。



【請求項 3 3】 請求項 1 ～ 3 2 記載の標的核酸の増幅方法で得られた標的核酸由来の増幅断片を検出する工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 3 4】 請求項 3 3 記載の標的核酸の検出方法において、得られた標的核酸由来の増幅断片を検出用プローブを用いて検出する工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 3 5】 検出用プローブがあらかじめ標識物質により標識されているプローブであることを特徴とする請求項 3 4 記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 3 6】 プローブが、消光状態になるような距離で配置された 2 種類以上の蛍光物質で標識された RNA プローブであることを特徴とする請求項 3 5 記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 3 7】 請求項 3 3 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の標的核酸の検出方法に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 3 8】 下記一般式で表される請求項 3 7 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

一般式：5' - d N a - N b - d N c - 3'

( a : 1 1 以上の整数、 b : 1 以上の整数、 c : 0 または 1 以上の整数、 d N : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、 N : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、 d N a の部位の一部の d N は N で置換されていてもよい)

【請求項 3 9】 c が 0 である請求項 3 8 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4 0】 デオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが ( α - S ) リボヌクレオチドである請求項 3 8 又は 3 9 に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4 1】 病原性微生物検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーである請求項 3 7 ～ 4 0 いずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4 2】 病原性微生物が腸管出血性大腸菌又はウイロイドである請

求項 4 1 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4 3】 配列表の配列番号 4 3～4 6、1 0 3、1 0 4、1 0 7～1 0 9、1 2 0～1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 4 2、1 4 3 でそれぞれ表される核酸配列を有する腸管出血性大腸菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4 4】 配列表の配列番号 1 1 5、1 1 6 でそれぞれ表される核酸配列を有するウイロイド検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 4 5】 請求項 1～3 2 のいずれか 1 項に記載の標的核酸の増幅方法に使用されるキットであって、請求項 3 7～4 4 のいずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする標的核酸の増幅用キット。

【請求項 4 6】 請求項 3 3～3 6 のいずれか 1 項に記載の標的核酸の検出方法に使用されるキットであって、請求項 3 7～4 4 のいずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする標的核酸の検出用キット。

【請求項 4 7】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含む DNA あるいは RNA を複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；

(b) (a) で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(d) (c) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項 4 8】 (b) 工程と (c) 工程が連続的に反復される請求項 1 記載の標的核酸の増幅方法。

【請求項 4 9】 少なくとも 2 種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含む DNA あるいは RNA を複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；

(b) (a) で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(d) (c) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (c) 工程に再度利用される工程；

(e) (d) 工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (b) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該 (b) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(f) (e) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(g) (f) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプラ

イマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(f)工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項50】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含むDNAあるいはRNAを複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；

(b) (a)で得られた鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

(c) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項51】 増幅しようとする配列を含むDNAを挿入したベクターが複製され、該ベクターが鋳型となることを特徴とする請求項47～50のいずれか1項に記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項52】 ベクターが大腸菌内で複製可能なベクターであることを特徴とする請求項51記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項53】 ベクターがpUC系、Bluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系の群より選択されることを特徴とする請求項52記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項54】 複製された鋳型となる核酸が、RNAを鋳型とした逆転写反応で得られたcDNAであることを特徴とする請求項47～50のいずれか1項に記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項55】 RNAがRNAポリメラーゼにより複製されたRNAであ

ることを特徴とする請求項 5 4 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 6】 RNA が、増幅しようとする配列を含む DNA の末端に RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を有する DNA から RNA ポリメラーゼ反応により複製された RNA であることを特徴とする請求項 5 5 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 7】 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を有する DNA が RNA プロモーター配列を有するアダプターあるいはカセットが付加されたものであることを特徴とする請求項 5 6 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 8】 増幅しようとする配列を含む DNA の末端に RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を有する DNA が、RNA プロモーター配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写反応によって得られた cDNA であることを特徴とする請求項 5 6 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 9】 オリゴヌクレオチドプライマーが、RNA プロモーター配列を有するランダムプライマー、オリゴ dT プライマーあるいはスペシフィックプライマーのいずれかから選択されることを特徴とする請求項 5 8 に記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 0】 RNA が、増幅しようとする配列を含む DNA が挿入され、RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を有するベクターから RNA ポリメラーゼにより複製された RNA であることを特徴とする請求項 5 5 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 1】 ベクターが pUC 系、Blue script 系、pGEM 系、コスミド系、ファージ系の群より選択されることを特徴とする請求項 6 0 載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 2】 RNA ポリメラーゼが、SP6 RNA ポリメラーゼ、T7 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼの群より選択されることを特徴とする請求項 5 5 ～ 6 1 のいずれか 1 項に記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 3】 請求項 1 ～ 3 2 及び請求項 4 7 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の核酸配列の増幅方法を用いた核酸配列の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床分野において有用な標的核酸の検出方法及び遺伝子工学分野において有用なDNAの合成方法に関し、鋳型となる核酸配列の増幅方法および該方法で増幅された標的核酸の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学分野の研究においてDNAの合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖のDNAの合成を除けば、そのほとんどはDNAポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR法）があるが、それは米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,800,159号に詳細に記述されている。もう一つの例としては、トレンズ イン バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology）第10巻、146～152頁（1992）に記載の当該方法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写PCR法（RT-PCR法）が挙げられる。上記の方法の開発により、DNAから、若しくはRNAから目的とする領域を増幅することが可能になった。

【0003】

これらのDNA合成方法は、目的とするDNA領域を増幅させるために例えば、二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップからなる反応により、もしくは、“シャトルPCR”（『PCR法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））と呼ばれる、前述の3ステップ反応のうちプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう2ステップ反応により実施される。

【0004】

さらに、別法としては、1989年6月14日に公開された欧州特許出願第3

2 0, 3 0 8 号に記述されているリガーゼ連鎖反応 (LCR; ligase chain reaction) 法、あるいは PCR プロトコルズ (PCR Protocols, Academic Press, Inc., 1990) 2 4 5 ~ 2 5 2 頁に記述されている転写増幅システム (TAS; transcription-based amplification system) 法が挙げられる。上記 4 法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

## 【 0 0 0 5 】

従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2 種類 ~ 3 種類の温度条件で行なうため設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

## 【 0 0 0 6 】

そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。例えば、特公平 7 - 1 1 4 7 1 8 号に記載の鎖置換型増幅 (SDA; strand displacement amplification) 法、自立複製 (3SR; self-sustained sequence replication) 法、日本国特許番号第 2 6 5 0 1 5 9 号に記載の核酸配列増幅 (NASBA; nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (transcription-mediated amplification) 法、日本国特許番号第 2 7 1 0 1 5 9 号に記載の Q $\beta$  レプリカーゼ法、さらに米国特許番号第 5, 8 2 4, 5 1 7 号、国際公開パンフレット第 9 9 / 0 9 2 1 1 号、国際公開パンフレット第 9 5 / 2 5 1 8 0 号あるいは、国際公開第 9 9 / 4 9 0 8 1 号等に記載の種々の改良 SDA 法が挙げられる。米国特許番号第 5, 9 1 6, 7 7 7 号には等温状態でのオリゴヌクレオチドの酵素的合成方法が記載されている。これらの等温核酸増幅法またはオリゴヌクレオチド合成法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物 (または元の標的配列) へのプライマーのアニーリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。

## 【 0 0 0 7 】

これらの等温核酸増幅法のうち最終的に DNA が増幅される系、例えば、SD

A法は、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼを介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）の増幅法であるが、該方法では、増幅に使用するプライマーは4種類必要であり、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、DNA合成のための基質として、修飾されたデオキシリボヌクレオチド3リン酸、例えば $\alpha$ 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子（S）に置換された（ $\alpha$ -S）デオキシリボヌクレオチド3リン酸を大量に用いる必要があり、ルーチンワークで反応を行なう遺伝子検査等においては、そのランニングコストが深刻な問題となってくる。さらに該方法では、増幅されたDNA断片中に上記の修飾ヌクレオチド、たとえば（ $\alpha$ -S）デオキシリボヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅後のDNA断片を制限酵素長多型（RFLP；restriction enzyme fragment length polymorphism）解析に供しようとする場合に、該断片が制限酵素で切断できないことがある。

#### 【0008】

また、米国特許番号第5,824,517号記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、少なくとも3'末端にDNAが配置された構造を必須要件とするキメラプライマーを使用するDNA増幅方法である。また、国際公開パンフレット第99/09211号に記載の改良SDA法は、3'突出末端を生じさせる制限酵素が必要である。また、国際公開パンフレット第95/25180号に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマー対を必要とする。さらに、国際公開パンフレット第99/49081号に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマーと少なくとも1種類の修飾デオキシリボヌクレオチド3リン酸を必要とする。一方、米国特許番号第5,916,777号は、オリゴヌクレオチドを合成するために、3'末端にリボヌクレオチドを有するプライマーを使用してDNAを合成し、反応終了後にエンドヌクレアーゼによりプライマー伸長鎖中のプライマーと伸長鎖の間にニックをいれて分離させ、テンプレートを消化し、さらにプライマーを回収して再利用するというものである。該方法では、プライマーを再利用する際には反応系よりプライマーを単離したうえで鋳型を再度アニーリングさせる必要がある。



【 0 0 0 9 】

上記のように従来の等温核酸増幅法はまだまだ種々の問題をかかえており、低ランニングコストで、かつ結果的に得られたDNA断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することが可能な核酸配列の増幅方法が求められていた。

【 0 0 1 0 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の主な目的は、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するDNA合成反応により試料中の標的核酸の高感度、特異的に増幅する標的核酸の増幅方法、該方法によって得られた増幅断片の検出方法、該増幅方法を用いた標的核酸の製造方法及びこれらの方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを提供することにある。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、リボヌクレオチドが3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー、エンドリボヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼの存在下に目的とする領域のDNAを増幅する方法を見出し、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。該方法は、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いる核酸配列増幅方法であり、本願明細書ではICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法と称する。

【 0 0 1 2 】

本発明の第1の発明は、標的核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含し、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法に関する。

本発明の第 1 の発明において、(b) 工程と (c) 工程は連続的に反復されることができる。

本発明の第 2 の発明は、少なくとも 2 種類のプライマーを使用する、標的核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (c) 工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該 (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(e) (d) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (e) 工程に再度利用される工程；  
を包含し、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法に関する。

本発明の第 3 の発明は、標的核酸を増幅するための方法において、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含し、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の検出方法に関する。

第 3 の発明においては、さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することができる。

上記の第 1 ～第 3 の発明において、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域としては 2 0 0 b p 以下の鎖長の領域が例示される。

本発明の第 1 ～第 3 の発明には、下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

一般式：5' - d N a - N b - d N c - 3'

(a : 1 1 以上の整数、b : 1 以上の整数、c : 0 または 1 以上の整数、d N : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、d N a の部位

の一部の d N は N で置換されていてもよい)

該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、c が 0 であるプライマー、ならびにデオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドであるプライマーが例示される。さらにこれらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する場合には、当該プライマーに適した DNA 伸長反応温度で DNA 伸長反応が実施される。

上記の第 1 ～ 第 3 の発明の増幅方法は、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、当該核酸と当該プライマーのアニールリングを増強する物質を含有するアニールリング溶液中でアニールリングさせる工程を包含することができる。上記のアニールリング溶液としてはスペルミジン及び／又はプロピレンジアミンを含有するものが例示される。当該アニールリング処理は、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有するアニールリング溶液を 90℃ 以上で保温した後、増幅反応が実施される温度以下に冷却して行うことができる。

第 1 ～ 第 3 の発明の増幅反応は、ピシン、およびヘプスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で実施することができる。

上記の第 1 ～ 第 3 の発明においては、DNA ポリメラーゼとして鎖置換活性を有する少なくとも 1 種の DNA ポリメラーゼを使用することができ、例えば、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNA ポリメラーゼからなる群から選択される DNA ポリメラーゼを使用ができる。また、エンドヌクレアーゼとしては、エンドリボヌクレアーゼ、例えば R N a s e H のようなエンドリボヌクレアーゼを使用することができる。

第 1 ～ 第 3 の発明の一態様として、DNA ポリメラーゼとしてバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNA ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼとして大腸菌由来 R N a s e H を使用する態様が挙げられる。大腸菌由来 R N a s e H としては I 型 R N a s e H が例示される。

第1～第3の発明にはエンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。当該DNAポリメラーゼとしてはバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼが使用でき、該DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質の存在下に増幅反応を実施することができる。B c a DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質としてはマンガンイオンが例示される。

第1～第3の発明の標的核酸の増幅方法は、DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質の存在下で実施することができる。DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質としてはホスホノギ酸が例示される。

本発明の第1～第3の発明は、一本鎖または二本鎖のDNAを鋳型として実施することができ、鋳型となる核酸が二本鎖DNAである場合には、これを一本鎖DNAにする工程の後に増幅反応が実施される。

上記の鋳型となる核酸はRNAを鋳型とした逆転写反応によって得られたcDNAであってもよく、RNAを鋳型とした逆転写反応によってcDNAを合成する工程の後に増幅反応を実施する態様が例示される。当該逆転写反応には逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができ、例えば、逆転写反応と鋳型に相補的な伸長鎖の合成とを、逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有する1種のDNAポリメラーゼにより実施することができる。このようなDNAポリメラーゼとしては、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B s t DNAポリメラーゼ、もしくは、バチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼが例示される。

本発明の第4の発明は、上記の第1～第3の発明の標的核酸の増幅方法で得られた標的核酸由来の増幅断片を検出する工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法に関する。

該検出方法の一態様としては、得られた標的核酸由来の増幅断片を検出用プローブを用いて検出する工程を包含する方法が挙げられる。該検出用プローブとしてはあらかじめ標識物質により標識されているプローブが使用でき、例えば消光状態になるような距離で配置された2種類以上の蛍光物質で標識されたRNAプ

ローブが例示される。

本発明の第5の発明は、上記の第4の発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、例えば下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

一般式： $5' - dNa - Nb - dNc - 3'$

(a：1以上の整数、b：1以上の整数、c：0または1以上の整数、dN：デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N：未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、cが0であるプライマー、ならびにデオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが(α-S)リボヌクレオチドであるプライマーが例示される。さらに、腸管出血性大腸菌、ウィロイド等の病原性微生物検出用のキメラオリゴヌクレオチドプライマーも本発明に包含される。

本発明の第6の発明は、配列表の配列番号43～46、103、104、107～109、120～125、126、127、142、143でそれぞれ表される核酸配列を有する腸管出血性大腸菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第7の発明は、配列表の配列番号115、116でそれぞれ表される核酸配列を有するウィロイド検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第8の発明は、本発明の第5の発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする、第1～第3の発明の標的核酸の増幅方法に使用されるキットに関する。

本発明の第9の発明は、本発明の第5の発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする、標的核酸の検出方法に使用されるキットに関する。

本発明の第10の発明は、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含むDNAあるいはRNAを複製して、鋳型となる核酸を調製する工程；

(b) (a) で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3' 末端又は3' 末端側に配置され；

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(d) (c) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3' 末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第10の発明において、(b) 工程と(c) 工程は連続的に反復されることができる。

本発明の第11の発明は、少なくとも2種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含むDNAあるいはRNAを複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；

(b) (a) で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3' 末端又は3' 末端側に配置され；

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(d) (c) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライ

マー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(c)工程に再度利用される工程；

(e) (d)工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として(b)工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも1種のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該(b)工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

(f) (e)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(g) (f)工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(f)工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第12の発明は、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含むDNAあるいはRNAを複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；

(b) (a)で得られた鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

(c) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、



を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

上記の第10～12の発明において、増幅しようとする配列を含むDNAを挿入したベクターが複製され、該ベクターが鋳型となるして使用される態様が例示される。上記ベクターとしては大腸菌内で複製可能なベクターを使用することができ、pUC系、Bluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系の群より選択されるベクターが例示される。

上記の第10～12の発明において、複製された鋳型となる核酸はRNAからの逆転写反応で得られたcDNAであることができ、該RNAはRNAポリメラーゼにより複製されたRNAであってもよい。

該RNAは、例えば、増幅しようとする配列を含むDNAの末端にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するDNAを鋳型としてRNAポリメラーゼ反応により複製されたRNAであってもよい。ここで、鋳型となるDNAとしては、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するアダプターあるいはカセットが付加されたDNAや、RNAプロモーター配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写反応によって得られたcDNAが例示される。また、上記のオリゴヌクレオチドプライマーとしては、RNAプロモーター配列を有するランダムプライマー、オリゴdTプライマーあるいはスペシフィックプライマーが挙げられる。

さらに、上記のRNAは、増幅しようとする配列を含むDNAが挿入され、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するベクターからRNAポリメラーゼにより複製されたRNAであることができる。当該ベクターとしてはpUC系、Bluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系の群より選択されるベクターが例示される。

上記の、RNAの複製において使用されるRNAポリメラーゼとしては、SP6 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼの群より選択されるものが例示される。

本発明の第13の発明は、上記の第1～第3、第10～12の発明の核酸配列の増幅方法を用いた核酸配列の製造方法に関する。

## 【 0 0 1 3 】

## 【発明の実施の形態】

本明細書においてデオキシリボヌクレオチド（本明細書中では d N とも記載する）とは、糖部分が D - 2 - デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。さらに、7 - デアザグアノシン等の修飾塩基を有するデオキシヌクレオチドやデオキシイノシンヌクレオチドのようなデオキシヌクレオチドアナログも上記のデオキシヌクレオチドに包含される。

## 【 0 0 1 4 】

本明細書においてリボヌクレオチド（本明細書中では N とも記載する）とは、糖部分が D - リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチドが包含され、例えば  $\alpha$  位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えた修飾リボヌクレオチド [ (  $\alpha$  - S ) リボヌクレオチド、 (  $\alpha$  - S ) N とも記載する ] やその他の誘導体等も含まれる。

## 【 0 0 1 5 】

本明細書においてキメラオリゴヌクレオチドプライマーとは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するプライマーのことを言う。該プライマーはデオキシリボヌクレオチドアナログおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有していてもよい。

## 【 0 0 1 6 】

本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側にリボヌクレオチドを配置し、本発明の方法において核酸鎖が伸長でき、エンドヌクレアーゼで切断でき、鎖置換反応を行うことができるものであれば、いずれもが本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに包含される。

## 【 0 0 1 7 】

本明細書において 3' 末端側とは、核酸、例えば、プライマーにおいてその中央より 3' 末端にかけての部分を目指す。同様に 5' 末端側とは、核酸においてそ

の中央より5' 末端にかけての部分を目指す。

【0018】

本明細書においてエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、該プライマーのリボヌクレオチド部分を特異的に切断するものであればよい。

【0019】

本明細書においてDNAポリメラーゼとは、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を合成する酵素のことを言う。特に限定はされないが、ポリI型DNAポリメラーゼ（大腸菌DNAポリメラーゼI、クレノウ断片、Taq DNAポリメラーゼなど）、 $\alpha$ 型DNAポリメラーゼ（ピロコッカス フリオサス由来DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）、VENT DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラプス社製）、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡社製）、DEEP VENT DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラプス社製）及び非 $\alpha$ 非ポリI型DNAポリメラーゼ（国際公開第97/24444号パンフレット記載のDNAポリメラーゼ）等が挙げられる。また、鎖置換(Strand displacement)活性を有するDNAポリメラーゼとしては、バチルス カルドテナックス (*Bacillus caldotenax*、以下、B. c a と称す) やバチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*、以下B. s t と称す) 等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ及び該DNAポリメラーゼの5'  $\rightarrow$  3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体等が挙げられる。さらに、上記クレノウ断片のような鎖置換活性を有し、5'  $\rightarrow$  3' エキソヌクレアーゼ活性を有していないDNAポリメラーゼも鎖置換型DNAポリメラーゼに含まれる。さらに、上記DNAポリメラーゼは、複数のDNAポリメラーゼの混合物、特に限定はされないが上記鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ及び鎖置換活性を有さないDNAポリメラーゼを組み合わせた混合物でもよい。

【0020】

本明細書において「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている

相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換 (strand displacement) することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを「置換鎖」と称する。

#### 【0021】

以下、本発明を詳細に説明する。

##### (1) 本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマー

本発明の方法において使用されるプライマーは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。該プライマーには未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有するオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。さらに、該プライマーは、デオキシヌクレオチドアナログを含有してもよい。

#### 【0022】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有し、その3'末端よりDNA鎖の伸長が可能であり、さらに、DNA合成反応中にエンドヌクレアーゼにより切断される部位をその3'末端又は3'末端側に有するものであれば良い。例えば、その3'末端又は3'末端側にリボヌクレオチドが配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。当該プライマーは通常、増幅しようとする領域の上流、すなわち鋳型核酸上の増幅しようとする領域に対応する塩基配列の3'側部分に相補的に設計される。なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。

#### 【0023】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは1以上の修飾リボヌクレオチドを含有するものであってもよい。即ち、本明細書においてリボヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、エンドヌクレアーゼにより認識あるいは切断されるものであれば、未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドのいずれであってもよく、そのような未修飾あるいは修飾リボヌクレオチドのいずれも

が包含される。すなわち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、当該プライマーの機能を失わない範囲で未修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチドを使用することができ、さらにこれらを組合せて使用することができる。このような修飾リボヌクレオチドとしては、特に限定するものではないが、たとえば、リン酸基に結合する酸素原子が硫黄原子に置換された ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドや、リボースの2位の水酸基がメトキシ基に置換されたりボヌクレオチドが挙げられる。このような修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、米国特許第5, 003, 097号記載の硫化反応試薬（グレンリサーチ社製）を用いた方法で調製した ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチド3リン酸、あるいは2-OMe-RNA-CE ホスホアミダイド試薬（グレンリサーチ社製）を用いて作製することができる。

## 【0024】

また、エンドヌクレアーゼによる切断に耐性を付与するような性質の修飾リボヌクレオチドを含有し、本発明の増幅方法に使用できるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設計してもよく、この様なプライマーは、増幅反応工程におけるエンドヌクレアーゼの切断位置を制御し得る点において有用である。

本発明の方法で使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のDNA断片を一本鎖もしくは二本鎖のいずれの形態で得たいかによって1種類もしくは2種類を使い分けることができる。すなわち、一本鎖DNAが望まれる場合には1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、また、二本鎖が望まれる場合には2種類のプライマーが使用される。

## 【0025】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、特に限定するものではないが、約12ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの長さのものが好ましい。さらに好ましくは、約15ヌクレオチドから約40ヌクレオチドの長さのプライマーである。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、実質的に鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。該プライマーは、後に示す段階で使用されるエンドヌクレアーゼにより認識される配列を3'末端又は3'末端側に含む。

## 【 0 0 2 6 】

本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドを本発明のDNA合成方法にプライマーとして使用することができる。

一般式： $5' - dNa - Nb - dNc - 3'$

( $a$  : 1以上11以下の整数、 $b$  : 1以上の整数、 $c$  : 0または1以上の整数、 $dN$  : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、 $N$  : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、 $dNa$ の部位の一部の $dN$ は $N$ で置換されていてもよい)

例えば、上記一般式において $a = 1$ 以上11以下の任意の整数で、 $b = 1$ 、 $c = 0$ のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、 $b = 2$ 、 $c = 0$ のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、 $b = 3 \sim 5$ 、 $c = 0$ のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、さらに $b = 2$ 、 $c = 0 \sim 5$ のキメラオリゴヌクレオチドプライマー等がいずれも本発明に好適に使用できる。即ち、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端又は3'末端側のリボヌクレオチドの長さは、好ましくは1mer $\sim$ 15mer、さらに好ましくは、1mer $\sim$ 10mer、特に好ましくは1mer $\sim$ 5merである。また、上記一般式中の $c$ の数は、特に限定はなく、本発明の方法に使用できる数を選択すればよいが、通常5以下が好適であり、4、3、2、1、の順に反応結果が良く、特に $c = 0$ の場合が最も反応効率がよい。

## 【 0 0 2 7 】

本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーよりDNAポリメラーゼで伸長されたDNA鎖（プライマー伸長鎖）に含まれるリボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼで切断されるような構造を有している。すなわち、上記のキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、エンドヌクレアーゼにより切断を受けるようにリボヌクレオチドがその3'末端又は3'末端側に配置されている。例えば、鋳型核酸にアニーリングした、上記の一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAにRNase Hを作用させた場合には、上記キメラオリゴヌクレオ

チドプライマーのリボヌクレオチド部分が切断され、上記オリゴヌクレオチドプライマーと伸長により合成されたDNA鎖の間にニックの入った二本鎖DNAが生じる。さらに、該ニックの入った部位からDNAポリメラーゼにより鎖置換反応がおこる。従って、プライマーの3'末端から核酸鎖を伸長させることができ、エンドヌクレアーゼにより切断されることができ、そしてDNAポリメラーゼにより鎖置換反応ができるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは全て本発明の方法に使用することができる。

## 【0028】

さらに本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、上記のリボヌクレオチドが配置された部位の5'側に1以上のデオキシリボヌクレオチドアナログを含有するものであってもよい。即ち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、当該プライマーの機能を失わない範囲でデオキシヌクレオチドアナログを含有させることができ、さらに、当該ヌクレオチドアナログは複数の種類のものを組合せて使用することができる。該デオキシヌクレオチドアナログとしては、特に限定はされないが、例えば、デオキシイノシンヌクレオチドあるいは7-デアザグアニンのような修飾塩基を有するデオキシヌクレオチドアナログが挙げられる。

## 【0029】

デオキシヌクレオチドアナログのプライマーへの導入は、プライマー自身の高次構造形成を抑制する観点からも有効である。さらに、同様の目的でリボヌクレオチドをプライマーに導入しても良い。特に限定するものではないが、非特異的なエンドヌクレアーゼ(RNase)によるプライマーの分解を防ぐ観点からは、例えば、( $\alpha$ -S)リボヌクレオチドのような修飾リボヌクレオチドが好適に使用できる。

## 【0030】

これらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド バイオシステムズ社(ABI社、Applied Biosystem Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホ

スホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

### 【0031】

#### (2) 本発明に使用されるエンドヌクレアーゼ

本発明に使用されるエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした上記(1)に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、鎖置換反応が起こるように伸長鎖を切断するものであればよい。即ち、上記の二本鎖DNAのうちのキメラオリゴヌクレオチドプライマー部分にニックを生成する酵素である。特に限定されるものではないが、例えば、本発明にはリボヌクレアーゼが使用でき、特にDNAとRNAとから形成された二本鎖核酸のRNA部分に作用するエンドリボヌクレアーゼH (RNase H) が好適に使用できる。また、該リボヌクレアーゼには、上記作用を有するものであれば、常温性から耐熱性のリボヌクレアーゼのいずれもが好適に本発明に使用できる。例えば、下記実施例に示すように、約50℃～約70℃での反応では大腸菌 (E. coli) 由来のRNase Hが本発明の方法に使用することができる。また、本発明の方法においては、耐熱性のリボヌクレアーゼも好適に使用できる。該耐熱性リボヌクレアーゼとしては、特に限定はされないが、例えば市販のHybridase™ Thermostable RNase H (エピセンターテクノロジーズ社製) 等も好適に使用できる。さらに、該リボヌクレアーゼは、天然体および変異体のいずれもが好適に使用できる。なお、本願明細書に記載されているRNase Hの酵素単位は、実施例中の参考例に示した酵素単位測定方法に基づいて表示された数値である。

### 【0032】

また、上記RNase Hは、本発明の方法に使用できるものであれば特に限定はなく、例えば、種々のウイルス、ファージ、原核、真核生物由来のいずれであってもよい。さらに、細胞性RNase Hあるいはウイルス性RNase Hのいずれであってもよい。例えば、上記細胞性RNase Hとしては大腸菌RNase HIが、ウイルス性RNase HとしてはHIV-1が例示される。本発明の方法においてRNase Hは、I型、II型、III型のいずれもが使用できる。特に限定はされないが、例えば大腸菌由来RNase HI型が好適である。



## 【 0 0 3 3 】

また、本発明の方法に使用するエンドヌクレアーゼ、例えば、RNase Hの切断反応の効率は上記プライマーの3'末端近傍の塩基配列に左右され、所望のDNAの増幅効率に影響することが考えられるので、使用するRNase Hに最適なプライマーをデザインすることは当然のことである。

## 【 0 0 3 4 】

本明細書において使用されている「ニックを入れる」もしくは「ニックング」という語は、二本鎖核酸の一方の鎖の内部を切断することを意味する。たとえば、RNase HはDNAとリボヌクレオチドを含むDNAとのハイブリッド二本鎖核酸に作用し、二本鎖のうちのリボヌクレオチドを含む鎖のリボヌクレオチド部分を選択的に切断することにより、当該ハイブリッド二本鎖核酸にニックを入れる。

## 【 0 0 3 5 】

## (3) 本発明に使用されるDNAポリメラーゼ

本発明には、DNAの鎖置換 (strand displacement) 活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。また、実質的に5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。

本発明において、「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換 (strand displacement) することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを「置換鎖」と称する。

## 【 0 0 3 6 】

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、上記の鎖置換活性を有するものであれば特に限定はなく、例えば、バチルス カルドテナックス (Bacillus caldofenax、以下、B. c a と称す) やバチルス ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus、以下B. s t と称す) 等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌 (以下、E. coli と称す) 由来のDNAポリメラーゼIのラージ フラ

グメント（クレノウ断片）等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性から耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。

B. c a は生育至適温度が約 70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来の B c a DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性（逆転写活性）、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。上記の酵素は、その本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換え蛋白質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損させた B c a DNAポリメラーゼである B c a B E S T DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）等が挙げられる。

#### 【0037】

なお、DNAポリメラーゼの中には、特定の条件でエンドヌクレアーゼ活性、例えば、R N a s e H活性を有するものが知られている。このようなDNAポリメラーゼを本発明の方法に用いることができる。すなわち、該DNAポリメラーゼをR N a s e H活性が発現されるような条件下、例えばMn<sup>2+</sup>の存在下で使用する態様が挙げられる。該態様においては、上記R N a s e Hを添加することなく本発明の方法を実施することができる。本発明者らは、Mn<sup>2+</sup>を含有する緩衝液中で上記のB c a DNAポリメラーゼがR N a s e H活性を示すことを初めて明らかにし、B c a DNAポリメラーゼ以外の酵素を含有しない反応液中で本発明の核酸増幅法が実施できることを実証した。なお、上記の態様はB c a DNAポリメラーゼに限定されるものではなく、R N a s e H活性を併せ持つことが知られている公知のDNAポリメラーゼ、例えばサーマス サーマフィラス (*Thermus thermophilus*)由来のT t h DNAポリメラーゼも本発明に使用することができる。

#### 【0038】

##### （４）本発明に使用される反応バッファーの組成

本発明に使用される反応バッファーには、緩衝成分、マグネシウム塩やその他

の金属塩、dNTPを含有するものが使用される。また、使用する酵素の金属要求性等に応じて塩の種類及び濃度を最適化するのは当然のことである。緩衝成分は、特に限定はないが、例えば、ピシン、トリシン、ヘペス、トリス、リン酸塩（リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等）が好適に使用できる。特にピシン、トリシン、ヘペス、あるいはリン酸塩を緩衝成分として含有するバッファーが本発明に好適である。特に限定はされないが、例えば、反応温度が高い場合は、温度変化によるpHの変化が少ないピシン緩衝液が好ましく、また使用するRNAse Hの種類によってはヘペス緩衝液が好ましい場合がある。従って、反応温度、使用するエンドヌクレアーゼあるいはDNAポリメラーゼ等によって、最適な緩衝液を選択すればよい。該緩衝成分の最終濃度は5 mM～100 mMの範囲、特に好ましくは20 mM～50 mMの範囲であり、またpH 6.0～9.5、特に好ましくはpH 7.0～9.2の範囲のものが使用される。例えば、22 mM～46 mMのトリシンを含有するpH 7.5～9.2のバッファー、あるいは25 mM～50 mMのリン酸カリウムを含有するpH 7.0～8.0のバッファーが好適に使用できる。また、マグネシウム塩としては、特に限定はないが、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムあるいは硫酸マグネシウムが好適に使用でき、その濃度は、最終濃度で1 mM～20 mM、特に好ましくは2 mM～10 mMの範囲である。また、DNA伸長反応の基質となるdNTPs（dATP、dCTP、dGTP、dTTP混合物）は、最終濃度で、それぞれ0.1 mM～3.0 mM、特に好ましくは0.2 mM～1.2 mMの範囲である。使用するプライマーの量は、反応液量50  $\mu$ l当たり1 pmol～1000 pmolの範囲であり、特に10 pmol～150 pmolの範囲が好ましい。さらに、反応液中には増幅反応の安定化等を目的とした添加物を共存させることができ、それぞれ最終濃度として0.1%以下のBSA、10%以下のジメチルスルホキシド、4 mM以下のブトレスシン2塩酸塩あるいは0.01%以下のプロピレンジアミンを添加してもよい。この他、NMP（1-メチル-2-ピロロリジノン）、グリセロール、ポリエチレングリコール、ジメチルスルフォキシドおよび／またはホルムアミドを含んでもよく、これらの有機溶媒の添加により、オリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングが軽減されることが期待される。

## 【0039】

さらに、DNAポリメラーゼが有している逆転写活性を阻害するような物質、例えばホスホノギ酸（PFA、Phosphonoformic acid）を添加して本発明の方法を実施してもよい。逆転写活性を阻害する物質を添加した場合には、標的核酸以外の非特異的な産物の増幅が低減される。

## 【0040】

さらにオリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングを軽減させる別の態様としては、本発明の検出方法、増幅方法あるいは製造方法において、増幅反応に先立って、鋳型となる核酸と本発明で使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング処理を行うことが効果的である。該処理はアニーリングを増強する物質、例えばスぺルミン、スぺルミジン等のポリアミン類やプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液を使用して実施することが好ましい。上記のポリアミン類を含有するアニーリング溶液としては塩を含有するものが好適に使用でき、特に限定するものではないが、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸カリウム、酢酸ナトリウム等とポリアミン類とを含有するアニーリング溶液が挙げられる。

## 【0041】

アニーリング処理は、通常、プライマー、鋳型となる核酸を含有する上記のアニーリング溶液を、2本鎖核酸が変性する温度、例えば、90℃以上で保持した後、本発明の方法に使用される反応温度以下まで冷却して実施される。

## 【0042】

アニーリング処理の工程の後、上記混合液にさらに必要な他の成分、例えばDNAポリメラーゼ、RNase H、dNTP等を添加して本発明の核酸増幅反応が開始される。

## 【0043】

エンドヌクレアーゼは、例えば、大腸菌由来のRNase Hならば、反応液量50μl当たり3～200Uの範囲が好ましく、特に15U～60Uの範囲が好適である。また、DNAポリメラーゼは、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼならば、反応液量50μl当たり0.5U～100Uの範囲、特に1U

～22Uの範囲が好ましい。

【0044】

本発明の方法においてエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼを組み合わせる場合、特に限定はされないが、例えば大腸菌由来のRNaseH及びBcaBE ST DNAポリメラーゼの組み合わせが好適である。さらに、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはいずれもその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想される。その際には、検出感度の向上あるいは増幅産物量を指標にして、使用されるバッファの組成ならびに酵素の添加量を調整すればよい。いずれの場合においても、使用する酵素の種類にあわせて反応バッファの組成等を至適化するのとは当然のことである。

【0045】

(5) 本発明の核酸配列の増幅方法

本発明の方法は、上記(1)に示されたオリゴヌクレオチドプライマーを少なくとも1種類使用し、さらに上記(2)に示されたエンドヌクレアーゼおよび上記(3)に示されたDNAポリメラーゼを組合わせて実施することができる。また、上記のようにRNaseH活性を有するDNAポリメラーゼをRNaseH活性が発現するような条件で使用することができる。

当該方法では、伸長反応の基質となるヌクレオチド3リン酸としてPCR法等に使われるdNTP、すなわちdATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物が好適に使用できる。当該dNTPは、使用されるDNAポリメラーゼの基質となる限りにおいては、dNTPのアナログ、たとえば7-デアザ-dGTP等を含んでいてもよい。また、当該方法では、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するが、当該プライマーは、例えば、DNA合成機等を用いて通常の合成方法と同様に調製することができる。さらに、本発明の方法においては、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと通常のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせ使用することもできる。

【0046】

本発明の方法においては、使用される酵素の活性が反応中に低下するおそれのある場合には、反応の途中で当該酵素をさらに添加することができる。特に限定

するものではないが、例えば、大腸菌由来のRNase Hを使用する反応の途中で該RNase Hをさらに添加してもよい。添加する酵素は、反応開始時に反応液中に含まれる酵素と同じものでもよいし、同じ作用を示す異なる種類の酵素であってもよい。すなわち、反応途中で添加することにより、検出感度の向上あるいは増幅産物量の増大等の効果が得られるならば、添加する酵素の種類及び該酵素の性質には何ら限定はない。

## 【0047】

本発明の方法において鋳型となる核酸、すなわちDNAまたはRNAは、当該核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から調製、あるいは単離したものでよい。さらに、上記試料を直接、本発明の核酸増幅反応に使用してもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、全血、血清、バフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等）のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料（食品、生物学的製剤等）、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破砕物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに上記試料中に含まれる核酸が公知方法で増幅されたDNAあるいはRNA等の核酸等も好適に使用できる。

## 【0048】

これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施

される。

#### 【0049】

RNA由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該RNAを鋳型とした逆転写反応によって合成されたcDNAを鋳型として本発明の方法を実施すればよい。本発明の方法に適用することができるRNAには、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全RNAの他、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子種が挙げられる。

#### 【0050】

上記の逆転写反応に使用されるプライマーは、使用される反応条件において鋳型RNAにアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、特定の鋳型RNAに相補的な塩基配列を有するプライマー（特異的プライマー）の他、オリゴdT（デオキシチミン）プライマーやランダムな配列を有するプライマー（ランダムプライマー）であっても良い。逆転写用プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは9ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは30ヌクレオチド以下である。さらに、逆転写用プライマーとして、逆転写後のcDNAを鋳型とした本発明の核酸配列増幅法を行う際に鎖置換反応のためのプライマーとして使用可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。このようなプライマーは、上記（1）に記載された性質を有し、かつRNAからの逆転写反応に使用できるものであれば特に限定はない。

#### 【0051】

上記の逆転写反応に使用される酵素としては、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素（AMV RTase）、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素（MMLV RTase）、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素（RAV-2 RTase）等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目

的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ（T t h DNAポリメラーゼ等）、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼが好ましく、B. s t 由来DNAポリメラーゼ（B s t DNAポリメラーゼ）、さらにB. c a 由来DNAポリメラーゼ（以下、B c a DNAポリメラーゼと記載する）が好ましい。例えば、B c a DNAポリメラーゼは、逆転写反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鋳型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することができる。上記の逆転写酵素活性を有する酵素も、当該活性を有している範囲において天然体、変異体のいずれもが使用できる。

#### 【0052】

本発明の方法による核酸の増幅においては、あらかじめ鋳型となる核酸を増幅しておくことにより、さらに効率よく目的の核酸を増幅できる場合がある。例えば、極めて少量のゲノムDNA等に存在する核酸配列を増幅する場合には、まず目的の核酸配列を含むDNA断片を適当な核酸増幅方法によって増幅し、次にこうして得られた増幅DNA断片を鋳型とした本発明の核酸の増幅方法を実施することができる。1段階目の増幅工程は本発明の方法で実施されてもよく、また公知の核酸増幅方法、例えばPCR法で実施されてもよい。また、この工程に使用されるプライマーの5'側にある特定の塩基配列を付加しておくことができる。このようなプライマーで増幅された断片を鋳型として使用する場合には、当該プライマーに付加された特定の塩基配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用して本発明の核酸増幅方法を実施することができる。すなわち上記のような特定の塩基配列を5'側に付加されたプライマーを使用したPCRを本発明の方法に組み合わせれば、PCRで増幅されたDNA断片を鋳型とした本発明の方法による核酸増幅工程は、増幅しようとする領域の塩基配列とは無関係に共通のキメラオリゴヌクレオチドプライマーで実施することが可能である。

#### 【0053】

通常、上記の1段階目の核酸増幅工程には、目的の核酸配列に応じて、当該配列を特異的に増幅するための特異的プライマー対を作製する必要があるが、非特



異的に核酸断片を増幅するようなランダムプライマーや、あらかじめ作成された縮重プライマーのセットから選択されるプライマー対を利用することにより、目的の核酸配列に特異的プライマーを使用することなく鋳型となる核酸を増幅することができる。例えば、ヌクレック アシズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 第24巻、19号、3778～3783頁(1996)に記載のタグ配列を有するランダムプライマーを使用するPCR法、あるいはジェノミックス (Genomics) 第13巻、718～725頁(1992)に記載のタグ配列を有する縮重プライマー (Degenerate primer) を用いたDOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR) 法を利用することにより多種類の鋳型核酸を増幅するために必要なプライマー対の数を少なくすることができる。これらのプライマーはいずれもその3'末端にランダムな配列、縮重した配列を有している。さらに、タグ配列を有するプライマーで増幅された核酸を鋳型として本発明の核酸配列増幅方法を実施する場合には、上記のようにタグ配列と同じ塩基配列を有する1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することにより、同一のタグ配列を有するプライマーで増幅されたすべての核酸を鋳型として本発明の方法を実施することができる。すなわち、ランダムプライマーや縮重プライマーを用いた核酸増幅法と本発明の方法を組み合わせれば、数多くの種類の核酸配列を非常に安価に、かつ大量に供給することができる。

#### 【0054】

上記核酸増幅法に用いられるDNAポリメラーゼとしては、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を合成する酵素であれば特に限定はされないが、ポリI型DNAポリメラーゼ(大腸菌DNAポリメラーゼI、クレノウ断片、Taq DNAポリメラーゼなど)、 $\alpha$ 型DNAポリメラーゼ(ピロコッカス フリオサス由来DNAポリメラーゼ、VENT DNAポリメラーゼ、KOD DNAポリメラーゼ、DEEP VENT DNAポリメラーゼ)及び非 $\alpha$ 非ポリI型DNAポリメラーゼ(国際公開第97/24444号パンフレット記載のDNAポリメラーゼ)等が挙げられる。また、少なくとも2種類のDNAポリメラーゼを組み合わせた混合物、例えばタカラ Ex Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)あるいはKOD dash DNAポリメラーゼ(東洋紡社製)等も好適に

使用できる。また、B. c a 由来DNAポリメラーゼ、B. s t 由来DNAポリメラーゼ及び該DNAポリメラーゼ及び該DNAポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体、9<sup>0</sup>N DNAポリメラーゼ、P f u (exo-) DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）、T t h DNAポリメラーゼ（東洋紡社製）、T f l DNAポリメラーゼ（プロメガ社製）等のDNAポリメラーゼも好適に使用できる。

## 【 0 0 5 5 】

また、PCR増幅断片のような直鎖DNA断片を本発明の核酸配列増幅方法の鋳型とする場合、鋳型となる当該直鎖DNA断片の3'末端から本発明の核酸増幅方法に用いるプライマーの5'末端のアニーリング位置との間にスペーサーと呼ばれる配列部分を設けると増幅効率が向上する場合がある。特に限定はないが、例えば、上記スペーサー部分の長さが1塩基～約70塩基、さらに好ましくは、約5塩基～約60塩基になるように本発明の核酸増幅方法用プライマーを設定するのが好ましい。なお、本発明の核酸配列増幅用プライマーの配列によっては、上記の好適なスペーサー部分の塩基数が異なる場合があるが、その場合最適なスペーサー部分を本明細書の実施例を参考に検討する事ができる。さらに、本発明の核酸増幅用プライマーのアニーリングする領域の3'側に上記のスペーサー部分が付加されるように、例えばPCRによって本発明の核酸増幅方法の鋳型となる核酸を予め増幅したのち、この増幅断片を本発明の核酸増幅方法の鋳型として使用することができる。1つの態様としては、5' → 3' 方向に上記スペーサー領域、本発明の核酸増幅方法用プライマー領域及び他の核酸増幅用プライマー領域を有するプライマーを用いて、予め鋳型となる核酸を増幅したのち、この増幅断片を本発明の核酸増幅方法の鋳型として使用することができる。なお、前述の他の核酸増幅用プライマー領域は、例えば、PCR法のような核酸増幅方法のためのプライマー領域であればよく特に限定はされない。あるいは、前述の他の核酸増幅用プライマー領域は、本発明の核酸増幅方法のための別のプライマー領域であってもよい。

## 【 0 0 5 6 】

また、別の態様としては、増幅しようとする塩基配列を含むDNAあるいはR

NAをあらかじめ複製した後、本発明の方法の鋳型となる核酸として用いてもよい。該複製の方法としては、特に限定はされないが、増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を挿入したベクターで適当な宿主を形質転換させた後、得られた形質転換体を培養して、上記増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を挿入したベクターを抽出して使用方法が例示される。該ベクターは、宿主内で安定して複製されるものであれば特に限定はなく、例えば、pUC系、Blue script系、pGEM系、コスミド系、ファージ系のいずれもが好適に使用できる。また、宿主は、使用されるベクターを保持することができるものであれば特に限定はなく、例えば、培養が容易な大腸菌等が例示される。

## 【0057】

さらに、上記複製の方法の別の態様としては、増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を鋳型としてRNAポリメラーゼで該塩基配列を有するRNAを転写した後、該RNAをそのまま、あるいは逆転写反応によりcDNAとして本発明の方法の鋳型に用いてもよい。上記増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片はRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有していれば特に限定はなく、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するベクターに挿入されたものでもよいし、末端にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するアダプターあるいはカセットをライゲーションさせたものでもよいし、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプライマーと適切な鋳型を用いて酵素的に合成したものであってもよい。すなわち、上記の増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を、上記のように配置されたRNAポリメラーゼのプロモーター配列を用いて、RNAの形で複製、増幅することができる。上記ベクターは、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するものであれば特に限定はなく、例えば、pUC系、Blue script系、pGEM系、コスミド系、ファージ系のいずれもが好適に使用できる。また、該ベクターは、環状のままあるいは直鎖状に処理したもののいずれもが好適に使用できる。さらに、上記複製、増幅方法に用いられるRNAポリメラーゼは特に限定はなく、例えば、SP6 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼあるいはT3 RNAポリメラーゼ等が好適に使用できる。

## 【0058】

上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような二本鎖DNA、および全RNA若しくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような一本鎖DNAのいずれもが本発明において鋳型DNAとして好適に使用できる。上記二本鎖DNAの場合は、一本鎖DNAに変性する工程（デネーチャー）を施したものが好適に使用できる。

## 【0059】

また、鋳型がPCR増幅産物のような直鎖状2本鎖DNAにおいては、本発明の方法に用いるプライマーがアニーリングする位置を、該DNAの末端から約50塩基程度内側に設定することにより、前述のデネーチャーの工程を行わなくても本発明の核酸配列の増幅方法を行うことができる場合がある。さらに、RNA由来の配列を有する核酸の増幅を目的とする場合には、本発明のDNAの合成方法に逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有するDNAポリメラーゼを使用することにより、RNAを鋳型とした逆転写反応と、当該反応によって生成したcDNAを鋳型にしたDNA増幅反応とを1種類のDNAポリメラーゼで行なうことができる。

## 【0060】

上記鋳型の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。

## 【0061】

本発明の方法は、鋳型DNAが二本鎖DNAの場合、それらを変性して一本鎖にすることにより鋳型DNA鎖へのプライマーの結合を可能にさせる。二本鎖DNAが変性する温度、例えば約95℃で保持することは好ましい変性法である。他の方法はpHの上昇を含むが、オリゴヌクレオチドプライマーを標的物に結合させるためには、増幅反応時にpHを低下させる必要がある。上記のような二本鎖を一本鎖DNAに変性する工程、もしくは、鋳型がRNAの場合、逆転写反応によりcDNA（一本鎖DNA）を調製する工程の後、等温条件下において、連続的に核酸配列が増幅される。

ここで、「連続的に」とは、反応温度、反応液組成の変更を伴わずに反応が進

行していることを意味する。また、本明細書において「等温」とは、酵素および核酸鎖が上記各工程において機能する、実質的に一定の温度条件のことを意味する。

【0062】

本発明の核酸増幅方法は理論によって限定されないが、1つの態様としては、例えば、等温条件下、下記の工程が並行して連続し、繰返し起こると考えられる：

〔1〕 鋳型となるDNAを少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプライマーとアニーリングさせる工程；

〔2〕 プライマーの3'末端から鋳型DNAに相補的なDNAの伸長反応を行なう工程；

〔3〕 エンドヌクレアーゼで、〔2〕で伸長させたDNA鎖を切断する工程；

〔4〕 〔3〕で切断された部位の3'末端からDNA伸長反応を行なうと同時に、〔2〕で伸長させたDNA鎖を分解することなく鋳型DNAから遊離させる工程；

〔5〕 〔4〕の工程で得られた二本鎖ポリヌクレオチドを用いて〔3〕～〔4〕の工程を繰り返す工程。

【0063】

上記の反応は、例えば、クレノウ断片のような常温性DNAポリメラーゼを使用することにより常温（例えば37℃）でも実施できるが、耐熱性を有する酵素（エンドヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ）を使用して高温、例えば50℃以上で、さらに例えば60℃以上で実施することができる。この場合、プライマーの非特異的なアニーリングが抑制され、DNA増幅の特異性が向上し、また鋳型DNAの二次構造が解消されることによりDNAポリメラーゼの伸長性も向上する。さらに該方法においては、逆転写反応および核酸配列の増幅を連続して行なう態様も可能であり、上記反応に逆転写酵素を組み合わせ、あるいは逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを使用して、RNA由来の配列を有するDNAを増幅することができる。

【0064】

本発明の方法で実施される第1の態様は、一本鎖のDNAを鋳型として、少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

すなわち、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を該核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

#### 【0065】

本発明の方法で実施される第2の態様は、一本鎖のDNAを鋳型として、少なくとも2種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

すなわち、少なくとも2種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド

含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (c) 工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列の一部に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(e) (d) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (e) 工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明の方法で実施される第 3、第 4 の態様は、二本鎖の DNA を変性して一本鎖 DNA とする前処理の後に、当該一本鎖 DNA を鋳型としてそれぞれ第 1、もしくは第 2 の態様の核酸配列の増幅方法である。

#### 【 0 0 6 7 】

本発明の方法で実施される第 5、第 6 の態様は、RNA を鋳型とした逆転写反応により一本鎖の cDNA を調製した後、当該 cDNA を鋳型としてそれぞれ第 1、もしくは第 2 の態様の核酸配列の増幅方法である。

#### 【 0 0 6 8 】

本発明において、「再生されたプライマー伸長鎖」とは、鎖置換により新たに複製に用いられたオリゴヌクレオチドプライマーから伸長した、鋳型となる核酸配列に相補的なDNA鎖のことを言う。

本発明において、「再度利用され」とは、鋳型となる核酸配列と再生されたプライマー伸長鎖で構成された二本鎖DNAを再度鎖置換の工程に利用することを言う。

#### 【 0 0 6 9 】

上記の本発明の態様のいずれにおいても、まず一本鎖の鋳型DNAに該DNAに相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる。次にDNAポリメラーゼの作用により、当該プライマーの3'末端より鋳型DNAの残りの配列に沿って鋳型DNAに相補的なDNA（プライマー伸長鎖）を伸長させて二本鎖DNAを合成する。エンドヌクレアーゼは当該二本鎖DNAに作用してキメラオリゴヌクレオチドプライマー中のリボヌクレオチド部分の3'末端側を切断するが、これ以外の部分は切断しない。即ち、エンドヌクレアーゼは上記の二本鎖DNAにニックを入れるニッキング酵素として作用する。また、該エンドヌクレアーゼは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーと鋳型DNAの二本鎖DNA構造を変化させるとも考えられるが、本願発明は理論によって限定はされない。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼがニックの入った二本鎖DNAのニックの3'末端からDNA鎖を再伸長して新たなプライマー伸長鎖を生成し、同時にニックの3'末端から下流のDNAを遊離させる。こうして先に合成されたプライマー伸長鎖が新たなプライマー伸長鎖に置換される。

#### 【 0 0 7 0 】

本発明の核酸配列増幅方法は、鋳型核酸に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーと、置換鎖に相補的なもう1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの2種のプライマーを使用して実施することができる。この場合、一方のプライマーは鋳型となるDNA鎖に結合して鎖置換反応を起し、そして他方のプライマーは上記の鎖置換反応によって遊離した置換鎖に結合し、新たな鎖置換反応を開始する。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための鋳型として機能できることは明らかである。このように鋳型量が増加することにより、



非直線的に増幅産物が増加していく。

【0071】

二本鎖DNAを鋳型に用いて本発明の核酸配列増幅方法を実施する場合には、二本鎖DNAを変性する前または後に、キメラオリゴヌクレオチドプライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)、DNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを反応液に添加する。熱処理により二本鎖DNAを変性し、かつ耐熱性の酵素を使用しない場合には、変性後に酵素を添加することが好ましい。

【0072】

上記(2)に記述されたように、この方法において使用されるエンドヌクレアーゼは、プライマーのリボヌクレオチド部分において鎖を切断するように選択すべきである。特に好ましくはリボヌクレオチドの3'側である。さらにDNAポリメラーゼは、ニックの入ったDNA鎖を合理的な速度で解離させるように選択されるべきである。

【0073】

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、ニックの入った部位から下流への伸長鎖合成に伴い、先に伸長されたDNA鎖の置換を行う必要がある。そして重要なことは置換鎖を分解する可能性のある5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示さないことである。このようなDNAポリメラーゼ、例えば大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損変異体であるクレノウ断片、Bst DNAポリメラーゼ由来の同様の断片(ニューイングランドバイオラプス社製)、Bca由来のBcaBEST DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)が有用である。シークエネース1.0およびシークエネース2.0(米国バイオケミカル社)、ジーン(Gene)第97巻、13~19頁(1991)記載のT5 DNAポリメラーゼおよびφ29 DNAポリメラーゼも使用することができる。通常は5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼであっても、その活性が適当な阻害剤の添加により阻害することが可能な場合は、本発明のDNA合成方法に使用できる。

【0074】

本発明の核酸配列の増幅方法は、変温で行ってもよく、又は等温で行ってもよい。ここで変温とは、各工程の反応を妨げない範囲で各工程の反応温度を変化させることを意味する。すなわち、例えば、プライマーのアニーリング、相補鎖の合成反応、相補鎖のニッキング、そして置換反応のそれぞれに適した温度に変化させる場合のことをいう。

次に等温とは、各工程の反応温度を変化させず、各工程が実質的に一定の温度で行われることを意味する。いずれの場合においても、最適の反応条件となるように温度を設定するのは当然である。

#### 【0075】

本発明の核酸配列の増幅方法の1つの特徴としては、核酸の合成方法において温度を上げ下げする必要がないことにある。即ち、本発明は等温での核酸配列の合成方法を提供する。従来の多くの核酸増幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要があり、例えばサーマルサイクラーのような特別な反応装置を必要とするが、本発明の方法においては一定温度を保持できる装置のみでも実施することができる。このように、本発明の方法は、単一の温度で実施することができる。好ましくは、プライマーの非特異的なアニーリングが低減され、かつ鋳型となる核酸配列にプライマーが特異的にアニーリングするように反応温度、ストリンジェンシーのレベルを設定して実施される。特に限定するものではないが、上記のように耐熱性の酵素を用いて本発明の方法を高温条件下で行う事ができる。さらに、反応の効率を高く保つ観点から、本発明の方法は使用する酵素の活性が十分に保持される適当な温度で行うことが好ましい。従って、使用する酵素にもよるが、好ましい反応温度は、約20℃～約80℃であり、さらに好ましくは約30℃～約75℃であり、特に好ましくは、約50℃～約70℃である。特に高温条件下で反応を行う場合には、常温で反応を行う場合よりも鎖長の長いプライマーを使用することが好ましい。各反応温度に適したプライマーの配列及び長さの設定については、例えば、その $T_m$ 値を参考にしてもよく、あるいは市販のプライマー設計ソフト、例えば、OLIGO<sup>TM</sup> Primer Analysis software（宝酒造社製）を使用してもよい。例えば、本発明の方法において反応温度を55℃から60℃あるいは65℃に設定した

場合、該方法に使用するプライマーの長さとしては、特に限定するものではないが、例えば12ヌクレオチド～100ヌクレオチドの長さ、好ましくは14ヌクレオチド～50ヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは15ヌクレオチド～40ヌクレオチドの長さのプライマーが使用できる。このように反応温度を上げるこの効果としては、鋳型DNAの二次構造を解消できることが挙げられ、GC含量の高い鋳型核酸を使用した場合にも所望の核酸が増幅される。また、長鎖長の領域を増幅する場合においても同様の効果がある。該効果は、約60bp～約20kbpの範囲で、さらに約110bp～約4.3kbpの範囲で、特に約130bp～約1500bpの範囲で認められる。

## 【0076】

さらに、鋳型となる核酸のGC含量に応じて反応温度を調節し、増幅効率を向上させることができる。例えば、鋳型となる核酸としてGC含量の低いものを使用する場合には、増幅する鎖長やプライマーのT<sub>m</sub>値にもよるが、50～55℃で本発明の増幅反応を行うことができる。

## 【0077】

また、本発明の方法において、逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼ、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼを使用した場合、RNAからcDNAを調製する工程（逆転写反応）を含むRNA由来の核酸配列の増幅を簡便に実施することができる。また、RNAからcDNAを調製する工程を独立させて行い、その生成物（cDNA）を本発明の方法に鋳型DNAとして使用することもできる。

## 【0078】

いずれの場合においても、本発明の方法においては、適当な方法、例えば酵素を失活させたり反応温度を低下させて反応を停止させるか、または基質のうちのいずれか一つが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

## 【0079】

図1は、一本鎖DNAを鋳型にし、2種のプライマーを使用する場合の一態様を図示したものである。各工程を下記に示すが、各工程は並行、連続して行われる：

- (1) 鋳型となる一本鎖DNAとキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる工程；
- (2) プライマーの3'末端からDNA伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程；
- (3) プライマー中のリボヌクレオチドを含有する部位をエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程；
- (4) (3)の切断した部位よりDNAポリメラーゼにより鎖置換する工程；
- (5) (4)の工程で得られた鋳型および再生されたプライマー伸長鎖からなる二本鎖DNAが(3)の工程に再度利用され、また遊離した置換鎖が(6)の工程以降の反応に利用される工程；
- (6) (5)の工程の遊離した置換鎖を鋳型として(1)と異なるオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる工程；
- (7) プライマーの3'末端からDNA伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程；
- (8) プライマー中のリボヌクレオチドを含有する部位をエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程；
- (9) (8)の切断した部位よりDNAポリメラーゼにより鎖置換する工程；
- (10) (9)の工程で得られた鋳型および再生されたプライマー伸長鎖が(8)の工程に再度利用される工程。

【0080】

二本鎖DNAが鋳型の場合は、一本鎖DNAへの変性処理の後、それぞれのDNA鎖が上記工程(1)の鋳型になる。従って、得られる増幅産物の量は、一本鎖のDNAを鋳型にする場合よりも多く、また増幅産物の検出においては、一本鎖DNAを鋳型にする場合よりも短時間で行なうことができる。

【0081】

本発明の核酸配列の増幅方法は、核酸配列の増幅を利用した種々の実験操作、例えば核酸の検出、標識、塩基配列の決定に使用することができる。

また、本発明の核酸配列の増幅方法は、*in situ*核酸増幅方法、DNAチップのような固相担体上での核酸増幅方法あるいは多種類の領域を同時に増幅

するマルチプレックス核酸増幅方法として使用することができる。

【0082】

本発明の核酸配列の増幅方法の特徴の一つとして、一本鎖のDNAを調製することが可能なことが挙げられる。この目的のためには、1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法のみならず、2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法を使用することもできる。例えば、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる場合は、一方のオリゴヌクレオチドプライマー量を他方の量に対して過剰にして増幅反応を行なう、いわゆるアシンメトリック（非対称）-PCR法において採用される方法と同様のプライマー比率によって行なうことができる。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置換した産物の量に比べて過剰になる。

【0083】

本発明の核酸配列の増幅方法によれば実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のDNAを調製することができ、例えば、DNAチップのような核酸固定化物を作製するための一本鎖DNA、標的核酸検出のための一本鎖DNAプローブ、または長鎖PCR法のためのメガプライマーを容易にしかも短時間に作製することができる。また、本発明の方法を使用することにより、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを選択して増幅させることが可能である。従って、本発明はセンス配列あるいはアンチセンス配列を有する核酸の製造方法としても有用である。

【0084】

また、本発明の方法は、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝液中で行うことにより微量の鋳型となる核酸からでも所望の核酸配列領域を増幅することができる。

【0085】

さらに、本発明の核酸配列の増幅方法には経時的な温度調節が可能な反応装置を使用する必要がないため、大容量の反応液を使用して増幅反応を実施することができる。したがって、例えば医薬用途等に使用される核酸の工業的大量製造が可能である。

【0086】

本発明の核酸配列の増幅方法において使用するプライマーの利用効率は、ほぼ100%であり、従来の方法、例えばPCR法の利用効率に比べて5倍～10倍高くすることができる。

【0087】

(6) 本発明の核酸配列の増幅方法のためのキット

本発明は、前述の第1～第6の態様に記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるDNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼの使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼならびに鎖置換反应用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼを指示書に従って選択し、使用してもよい。さらに、RNAを鋳型とする場合の逆転写反应用試薬を含んでもよい。DNAポリメラーゼは、上記(3)記載の本発明に使用されるDNAポリメラーゼから選択することができる。また、エンドヌクレアーゼは、上記(2)記載のエンドヌクレアーゼから選択することができる。さらに、該鎖置換反应用緩衝液は、上記(4)記載の反応バッファー組成を有するものが好適に使用できる。

【0088】

上記「指示書」とは、当該キットの使用方法、例えば鎖置換反应用試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのよる電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

【0089】

(7) 本発明の標的核酸の検出方法および該方法のためのキット

本発明の核酸配列の増幅方法を使用することにより、試料中の標的核酸の検出を行うことができる。当該検出方法は、

(a) 上記の本発明の核酸配列の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および

(b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；  
を包含する。

【0090】

上記方法は試料中に存在する特定の遺伝子の検出、定量に利用することができる。すなわちDNAまたはRNA等の核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から特定の遺伝子を検出、定量することができる。前述の試料としては、特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等）のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料（食品、生物学的製剤等）、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料から特定の遺伝子を検出、定量することができる。さらに例えば、ウイロイド、ウイルス、カビ、細菌あるいはその他の微生物等由来の特定の遺伝子をターゲットとすることにより、該遺伝子の存在の有無によって、試料中のウイロイド、ウイルス、カビ、細菌あるいはその他の微生物の存在を検出、定量する方法等に利用することができる。特に、病原性の微生物の検出方法は衛生、環境分野で有用である。さらに、生物の遺伝子型の判別や遺伝子の発現状態を調べるために本発明の方法を使用することもできる。上記検出法のための鋳型として使用される核酸は、RNAあるいはDNAのいずれもが好適に使用できる。

【0091】

本発明の標的核酸の検出方法は、核酸を含有する試料より直接、標的核酸を増幅することにより実施することができる。この場合、増幅される標的核酸の鎖長には、特に限定はないが、感度よく標的核酸を検出する観点からは、例えば200bp以下、さらに好ましくは150bp以下の領域が有効である。該増幅鎖長となるように本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設定することにより、高感度に試料中の標的核酸を検出することができる。

## 【0092】

さらに、本発明の検出方法では、前述の（４）で例示したような、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びスペルミジンやプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液の使用により、微量の核酸試料からもさらに高感度に標的核酸を検出することができる。この場合、使用するエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼは特に限定はされないが、例えば大腸菌由来のRNase H及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好ましい。特に、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはともにその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には検出感度の向上あるいは増幅産物量の増加を指標にして、該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。

## 【0093】

上記（b）工程には公知の核酸検出方法、例えば電気泳動により特定のサイズの反応産物を検出する方法や、プローブとのハイブリダイゼーションによる検出等を使用することができる。電気泳動による検出には、通常、エチジウムブロマ이드等の蛍光物質が使用されるが、プローブとのハイブリダイゼーションを組み合わせてもよい。また、プローブは放射性同位元素による標識の他、ビオチンや蛍光物質のような非放射性的の標識を施したものが使用できる。この他、上記（a）工程において標識ヌクレオチドを使用することにより、増幅産物に標識ヌクレオチドを取り込ませて検出を容易とすることや、蛍光偏光法、蛍光エネルギー転移等を利用した検出を行うことも可能である。さらに、適切な検出系を構築することにより、標的核酸を自動的に検出することや、あるいは標的核酸の定量を行うことが可能である。

## 【0094】

消光状態になるような距離で配置された２種類以上の蛍光物質で標識されたりボヌクレオチド（RNA）プローブを本発明の検出方法に使用することができる。当該プローブは蛍光を発することはないが、これに相補的な標的核酸由来の増幅DNAにアニーリングした場合、RNase Hは該プローブを分解する。この結果、プローブ上の蛍光物質間の距離が増大して蛍光が発せられるようになり、



標的核酸の存在を知ることができる。RNase Hを使用して本発明の核酸配列の増幅方法が実施された場合には、その反応液中に上記のプローブを添加するだけで標的核酸を検出することができる。当該プローブの標識に使用される蛍光物質としては、例えば、6-FAM (6-carboxyfluorescein) と TAMRA (N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine) との組み合わせが好適に使用できる。

## 【0095】

本発明の核酸配列の増幅方法の等温下における増幅方法においては、サーマルサイクラーのような装置を必要としない。また本発明の増幅方法では、使用するプライマーを1種類もしくは2種類と従来法よりも少なくすることができる。dNTPのような試薬もPCR等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。さらに、本発明の方法はPCR法よりも短時間により多くの増幅産物を得られることから、簡便、迅速、高感度な遺伝子検出方法として利用することができる。

## 【0096】

ゲノムレベルの遺伝子解析においては、大量の塩基配列を解析するために反応系を微量化し、さらに集積度を高める試みがなされている。その手段の一つとして、最先端の超微細加工技術を駆使して、ゲノム解析の基本プロセス、例えば、DNAの細胞からの抽出、DNA増幅反応、電気泳動、ハイブリダイゼーション、目的DNAの検出等のプロセスを数 $\mu\text{m}$ 角～指先大のマイクロチップ上に集積化したものが開発されている。該システムはマイクロチップ、あるいはナノチップと呼ばれている。

このようなシステムにおける遺伝子増幅反応として現在はPCR法が考えられているが、該方法は経時的に温度の上昇、下降を繰り返す温度制御のための手段を必要とするため、システムが複雑なものとなる。これに対し、等温条件下で核酸を増幅できる本発明の方法はシステムの単純化が可能であり、上記のような集積化されたシステムでの利用に非常に好適である。さらに、本発明の技術を利用してさらに高い集積度のシステムの構築が可能となる。

## 【0097】

さらに、本発明においては、上記の標的核酸の検出方法に使用されるキットが提供される。該キットは、上記の本発明の核酸配列の増幅方法のためのキットを使用することができる。さらに、標的核酸の増幅に使用するためのキメラオリゴヌクレオチドプライマー、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。

## 【 0 0 9 8 】

さらに、本発明のキットにおいては、前述の（４）で例示したような、ピシン、トリシン、ヘベス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びアニーリング溶液が含まれていてもよい。さらに、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼやRNAse Hが含まれていてもよい。

## 【 0 0 9 9 】

## （８）本発明の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物とその製造方法

DNAチップは、多数の異なる遺伝子あるいはDNAの断片をスライドグラス等の固相担体上の所定の領域あるいは所定の位置に整列させて固定化した核酸固定化物であり、DNAマイクロアレイ（DNAアレイ）とも呼ばれる。DNAチップは、試料より調製した核酸試料、好ましくは標識された核酸試料と接触させてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸試料中に存在する、DNAチップ上の所定の領域に整列させて固定化されたDNAと相補的な配列を有する核酸の存在を調べる目的で使用される。試料中の多数の核酸を一度の操作で検出、定量できることから、DNAチップは遺伝子の発現解析や変異あるいは多型解析を飛躍的に加速させる手段として非常に有用である。二本鎖核酸が所定の領域に整列させて固定化されたDNAチップは適切な変性処理の後にハイブリダイゼーション工程に使用されるが、検出しようとする標的核酸に相補的な一本鎖DNAが所定の領域に整列させて固定化されたDNAチップは、標的核酸の検出に特に好適である。

## 【 0 1 0 0 】

上記のように、本発明の方法により所望のDNAを一本鎖の状態を増幅することができる。増幅物の精製方法に限定はないが、イソプロパノール沈殿による精製が好ましい。こうして得られたDNA、特に好ましくは実質的にその相補鎖を

含有しない一本鎖のDNAは、DNAチップ上に固定するDNA断片として好適に使用できる。即ち、本発明の方法は、DNAチップ作製において所定の領域に整列させて固定化するDNAを調製する方法として好適に使用できる。こうして得られたDNAを所定の領域に整列させて固定する担体は不溶性のものであれば特に限定はなく、ガラス、プラスチック等で作製された板状の担体の他、ニトロセルロースやナイロン製の膜状の担体が好適に使用される。また、その固定化にあたっては公知の核酸固定化方法が使用できる。上記のDNAはそのまま担体に固定化を行う他、適当なリンカーを介して、または複数分子のDNAをライゲーションさせたうえで固定化してもよい。

#### 【0101】

本発明の方法により増幅されたDNAを所定の領域に整列させて固定化した核酸固定化物、例えばDNAチップを試料より調製された標的核酸を含む可能性のある核酸試料と接触させ、ハイブリダイゼーションを実施することにより、当該核酸固定化物上の核酸とハイブリダイズした標的核酸を検出、定量することができる。特に、本発明の方法により増幅された一本鎖のDNAを所定の領域に整列させて固定化したDNAチップは、従来よりも簡便な操作で、かつ、高感度、高再現性での標的核酸の検出を可能とする。

#### 【0102】

##### (9) 本発明の核酸の大量製造方法

上記のように、本発明の一態様により等温で実施可能な核酸配列の増幅方法が提供される。該方法は、増幅しようとする核酸の鋳型となる核酸の他、反応に必要な各種成分を混合して等温条件下で反応させることにより、所望の核酸を製造することができる。PCR法では反応混合物の温度を経時的に変化させる必要があるため、反応のスケールは温度制御が可能な容量（通常、200 $\mu$ l以下）に限られ、スケールアップは困難である。一方、当該方法にはこのような制約はなく、反応混合物の容量を増加させることにより大量の核酸を製造することが可能である。当該方法は1分子の鋳型から多数の相補鎖分子が合成され、さらにこれらの相補鎖分子を鋳型とした核酸の合成も可能であることから、鋳型ならびにプライマーを適切に設定することにより、所望の核酸を効率よく、大量に製造する

ことができる。さらにまた、当該方法がPCR法のような特殊な装置、頻繁な温度変化を必要としないことは設備、エネルギーのコスト面からも有利であり、工業的な核酸の大量製造方法としても優れている。

## 【 0 1 0 3 】

さらに、本発明の製造方法では、前述の(4)で例示したような反応バッファー及びアニーリング溶液の使用により、微量の鋳型核酸からも目的とする核酸配列を増幅し、製造することができる。この場合、使用するエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼは特に限定はされないが、例えば大腸菌由来のRNase H及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好ましい。さらに、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはともにその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には増幅産物量の最大を指標にして、該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。

## 【 0 1 0 4 】

また、本発明の方法は、上記のDNAチップに固定化するためのDNA断片のような多種類、かつ大量のDNA断片を供給する方法として有用である。すなわち、1つの態様としては、単純な反応工程でDNA断片を大量に得ることができ、別の態様としては限られた種類のプライマーを使用して非常に多種類のDNA断片を得ることができる。後者は、本発明の方法の鋳型となる核酸を公知の核酸増幅方法、例えばPCR法等であらかじめ増幅する工程を組み合わせる実施することができる。例えば、ヌクレイック アシズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 第24巻、19号、3778～3783頁(1996)に記載のタグ配列を有するランダムプライマーを使用して核酸を増幅する方法あるいは、ジェノミックス (Genomics) 第13巻、718～725頁(1992)に記載の縮重プライマー (Degenerate primer) を用いたDOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR) 法に基づき、限られた種類のプライマーを使用してあらゆる種類の鋳型核酸を増幅することができる。さらに、前述のランダムプライマーや縮重プライマーに付加されたタグ配列にあわせて本発明の核酸増幅法に使用されるプライマーを設計すれば、上記の工程で作成されたあらゆる鋳型核酸について1もしくは数種類のプライマーで本発明の核酸増幅反応を実施することができ

る。このように、適切な鋳型核酸の調製工程と本発明の方法を組み合わせれば、多種類のDNA断片を従来よりも安価で、大量に供給することができる。

核酸を含有する医薬としては、細胞内において有用なポリペプチドを発現させるための二本鎖DNA、目的の遺伝子の発現を抑制するための一本鎖アンチセンスDNA等があり、これらは適切な手段、例えばリポソーム等の遺伝子導入用担体を使用して生体に投与される。本発明の核酸の製造方法は、上記のような医薬用途等の一本鎖、もしくは二本鎖の核酸を大量に製造するための方法として好適である。さらに、本発明の方法では、例えば生体内での分解を抑制するようなdNTPのアナログを含有する核酸を製造することも容易である。

#### 【0105】

本発明において増幅されたDNA断片は通常のヌクレオチドにより構成されるため、例えば、増幅されたDNAはその内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクローニングすることができる。さらにRFLPのような制限酵素を用いた処理をすることも問題なくでき、遺伝子検査の分野においても広く利用できる。また、増幅断片中にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を組込んでおけば、増幅断片を鋳型としてRNAを合成し、例えば、合成されたRNAをプローブとして使用可能である。当然ながら、通常のdNTPの代わりに蛍光標識されたdNTPを使用して本発明の核酸配列増幅方法を実施することにより、蛍光標識されたDNAプローブを作製することができる。

#### 【0106】

本発明の方法において、最終的に増幅される断片は、その両端に増幅に使用するプライマーに相補的な塩基配列を有さないため、増幅産物の持ち込みによるコンタミネーションを軽減させることができる。従って、ルーチンワークで同じ領域を増幅する遺伝子検査等において有用である。

#### 【0107】

本発明の核酸配列の増幅方法の特徴を以下に列挙する。

1. 少ない鋳型量より、大量の核酸を増幅することができる。2種のプライマーを使用した場合には増幅産物は2次関数的に増加する。
2. 等温でも実施でき、その場合サーマルサイクラーのような装置を必要とし

ない。このため、容易に反応容量をスケールアップすることができる。

3. 通常、増幅反応は1または2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーと2種の酵素（DNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼ）で実施される。

4. 1分子のプライマーより多数のDNA鎖が合成されるため、プライマー量が増幅産物量を制限することがない。さらに、プライマー使用効率が約100%とPCR法に比べて極めて高い。

5. 一本鎖、二本鎖のDNAを目的に応じ選択的に増幅することができる。

6. 増幅反応に（ $\alpha$ -S）dNTPのようなdNTPアナログを必要としないため、試薬コストが安価である。また、dNTPアナログを含有しない、天然型の核酸を取得することが可能である。

7. 他の核酸増幅方法あるいは核酸複製方法と組み合わせることにより、安価で大量のDNA増幅断片を供給することができる。

8. 本発明の検出方法は、従来法と比較して同等以上の検出感度を有する。さらに、同じ検出感度であれば、従来法よりも短時間で検出することができる。

9. マイクロチップ、ナノチップにおける核酸の増幅、検出の自動化、微量化、高集積化に適した方法である。

以上のように、本発明の方法は遺伝子の検出、工業的スケールでの核酸製造のいずれにも適した方法である。

#### 【0108】

##### 【実施例】

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【0109】

##### 参考例

本発明の方法に使用されるRNase Hのユニット数は、以下の方法で測定した。

##### （1）使用する試薬液の調製

力価測定用反応液：最終濃度がそれぞれ40 mM トリスー塩酸（pH 7.7、37℃）、4 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、0.003% BSA、4

%グリセロール、24  $\mu$ Mポリ (dT) になるように滅菌水で調製した。

ポリ [8-<sup>3</sup>H] アデニル酸溶液：370 kBq のポリ [8-<sup>3</sup>H] アデニル酸溶液を200  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

ポリアデニル酸溶液：ポリアデニル酸を3 mMになるように滅菌超純水で希釈した。

酵素希釈液：最終濃度がそれぞれ25 mMトリスー塩酸 (pH 7.5、37℃)、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mM EDTA (pH 7.5、37℃)、30 mM塩化ナトリウム、50%グリセロールになるように滅菌水で調製した。

熱変性子牛胸腺DNAの調製：子牛胸腺DNA 200 mgをTEバッファー100 mlに懸濁し、膨潤させた。該溶液のUV 260 nmの吸光度を測定し、1 mg/mlの濃度に滅菌超純水で希釈した。次に、該溶液を100℃で10分間加熱後、氷浴中で急冷した。

【0110】

## (2) 活性測定方法

上記(1)で調製した力価測定用反応液985  $\mu$ lにポリ [8-<sup>3</sup>H] アデニル酸溶液7  $\mu$ lを加え37℃で10分間保持した。次にポリアデニル酸を最終濃度が24  $\mu$ Mになるように8  $\mu$ l加え、さらに37℃で5分間保持した。このようにしてポリ [8-<sup>3</sup>H] rA-ポリ dT反応液1000  $\mu$ lを調製した。次に、該反応液200  $\mu$ lを分取し、30℃で5分間保持した後、任意の希釈系列で希釈した酵素液1  $\mu$ lを加え、これらの反応液を経時的に50  $\mu$ lずつサンプリングして、後の測定に用いた。酵素添加からサンプリングまでの間の時間をY分とした。また、全CPM用反応液50  $\mu$ lおよびブランク用反応液50  $\mu$ lは、酵素液の代わりに酵素希釈液を1  $\mu$ l加えて調製した。該サンプリング溶液に100 mMピロリン酸ナトリウム100  $\mu$ l、熱変性子牛胸腺DNA溶液50  $\mu$ lおよび10%トリクロロ酢酸300  $\mu$ l (全CPM測定の場合は、超純水300  $\mu$ l)を加え、0℃で5分間保持後、10000 rpmで10分間遠心した。遠心後、得られた上清250  $\mu$ lをバイアルに入れ、アクアゾルー2 (NENライフサイエンスプロダクツ社製) 10 mlを加え、液体シンチレーションカウン

ターでCPMを測定した。

【0111】

### (3) ユニット計算

各酵素のユニット (Unit) 数は、以下の計算式で算出した。

$$\text{Unit/ ml} = \{ (\text{測定したCPM} - \text{ブランクCPM}) \times 1.2^* \times 20 \times 1000 \times \text{希釈率} \} \times 200 (\mu\text{l}) / (\text{全CPM} \times Y \text{分} \times 50 (\mu\text{l}) \times 9^{**})$$

1. 2<sup>\*</sup>: 全CPM中に含まれるポリ [8-<sup>3</sup>H] r A-ポリ d T の 50 μl 当たりの nmol 数

9<sup>\*\*</sup>: 補正係数

【0112】

### 実施例 1

#### (1) 鋳型DNAとプライマーの合成

本実施例に鋳型として使用した 99 塩基の一本鎖DNAおよびプライマーは、DNA合成機（アプライド バイオシステム社製）を用いて合成した。配列表の配列番号 1 に上記の 99 塩基の一本鎖DNAの塩基配列を示す。本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す：

プライマー対 1：配列表の配列番号 2 および 3 に示される塩基配列を有し、その全体がすべてデオキシリボヌクレオチドで構築されたプライマーの組み合わせ；

プライマー対 2：配列表の配列番号 4 および 5 記載のプライマーであって、それぞれの 3' 末端から 2 個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドであり、かつ 3' 末端から 2 個めのリボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合であるプライマーの組み合わせ；

プライマー対 3：配列表の配列番号 6 及び 7 記載のプライマーであって、それぞれの 3' 末端のデオキシリボヌクレオチドのみがリボヌクレオチドであり、かつ当該リボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合であるプライマーの組み合わせ；

プライマー対 4：配列表の配列番号 8 及び 9 記載のプライマーであって、それぞれの 3' 末端から 2 個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドであり



たプライマーの組み合わせ；

プライマー対5：配列表の配列番号10及び11記載のプライマーであって、それぞれの3'末端から3、4個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドであり、かつ3'末端から4個めのリボヌクレオチドの5'側リン酸結合がホスホロチオエート結合であるプライマーの組み合わせ。

# 【0113】

## (2) 増幅反応

5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたバチルス カルドテナックス由来のDNAポリメラーゼであるBcaBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）と、大腸菌由来のRNase HであるclonedリボヌクレアーゼH（宝酒造社製）を用いて、以下のモデル1～7の反応系について検討した。

反応液は、下記のように調製した。

# 【0114】

35 mM トリス塩酸バッファー（pH 7.5）、0.1 mg/ml BSA（牛血清アルブミン）、2.7% グリセロール、5% ジメチルスルオキシド、各1.4 mM dNTP 混合物、10 mM 塩化マグネシウム、それぞれ20 pmolの（1）のプライマー対もしくはその一方のプライマー、ならびに0.6 ngの合成一本鎖鋳型DNA、5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60 UのclonedリボヌクレアーゼH、反応液の最終容量50  $\mu$ l。上記反応液を均一に混合し、55℃、60分間保温した後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の8  $\mu$ lを3% ヌシーブ3：1 アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。以下に各モデルに使用されたプライマーを示す：

モデル1～5：それぞれプライマー対1～プライマー対5を使用；

モデル6：プライマー対2のうちの下流プライマーのみを使用；

モデル7：プライマー対4を使用し、RNase Hを添加しない。

# 【0115】

その結果、モデル2～5の反応液を使用した場合、約40 bp (base pair)～約90 bpの範囲で目的のサイズの増幅断片が確認された。これらの反応系でD

NAが増幅されることが明らかとなった。また、一方のプライマーのみを使用したモデル6においても、予想される約70 b (base)の増幅断片（一本鎖DNA断片）が確認できた。なお、モデル1および7の反応ではDNAの増幅はまったく認められなかった。

## 【0116】

## （3）増幅産物の確認

上記（2）の、モデル4の反応によって得られた反応液をマイクロコンー100（宝酒造社製）を用いてろ過した後、フィルターにトラップされた増幅DNA断片を回収した。該DNA断片の塩基配列をジデオキシ法により解析した。その結果、上記の反応によって増幅された断片が鋳型DNAと同じ塩基配列を持つDNAである事が確認された。

## 【0117】

## （4）反応時間の検討

上記（2）のモデル2の反応液を調製し、これを種々の時間反応させた場合の増幅産物量の変化を調べた。当該反応液を、0、15、30、60、90、120分間、それぞれ55℃で保温した後、90℃、2分間の処理により酵素を失活させた。各反応液8  $\mu$  lを3% ヌシーブ3：1アガロースゲルを使用した電気泳動にて解析した。電気泳動の結果を図2に示す。図中1～6はそれぞれ0、15、30、60、90、120分間反応した反応液の泳動されたレーンを、また、Mは分子量マーカーとして、100 bp DNA ladder marker（宝酒造社製）が泳動されたレーンを示す。

## 【0118】

図2に示されるように、反応時間が0分では増幅産物は確認できなかったが、反応時間が15分、30分、60分と長くなるに従い、増幅産物量が増大していることが確認できた。しかし、60分以上の反応では、電気泳動によって確認される増幅産物量はほぼ横ばいであり、使用された反応系での増幅は60分程度でプラトーに達することが示された。

## 【0119】

## 実施例 2

## (1) RNAの調製

本実施例に鋳型として使用するRNAは、ヒト培養細胞HT29 (ATCC HTB-38) (大日本製薬社製) からライゾール試薬 (ライフテック社製) を用いて調製した。得られたトータルRNAは、その濃度を  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調製した。またRNAの純度を分光学的に調べたところ、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$  であった。

## 【0120】

## (2) 増幅反応

逆転写活性およびDNAポリメラーゼ活性を有するBcaBEST DNAポリメラーゼとRNaseHエンドヌクレアーゼを用いて、RNAからのcDNAが増幅されるかを検討した。

反応液には  $1 \mu\text{g}$  相当の上記トータルRNAを加え、実施例1と同様の組成に調製した。ジーンバンク (GenBank) 登録番号、X01060のヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を増幅のターゲットとし、プライマーとして実施例1に記載のプライマー対2を用いた。

## 【0121】

上記の反応液を  $55^{\circ}\text{C}$ 、60分間保温した後、 $90^{\circ}\text{C}$ 、2分間加熱して酵素を失活させた。この反応液のうちの  $8 \mu\text{l}$  を3% ヌシーブ3:1アガロースゲルにて電気泳動したところ、予想される56bpの増幅断片が確認できた。さらに、ターゲットとした塩基配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行なった。その5'末端にビオチン標識を付した、配列表の配列番号12に示される塩基配列のDNAプローブを使用してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、このプローブは上記の増幅断片にハイブリダイズした。即ち、本発明の方法によりターゲットとした領域が正しく増幅されていることが確認された。

## 【0122】

## 実施例3

## (1) プライマーの合成

二本鎖DNAを鋳型とした場合の本発明の増幅方法について検討した。使用す

るプライマーは、DNA合成機（アプライド バイオシステム社製）を用いて合成した。配列表の配列番号13～22に使用したプライマーを示す。さらに、本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す。プライマー対A～Fまでは、pUC19 DNA（宝酒造社製）を鋳型とした。pUC19のヌクレオチド配列はデータベース、ジーンバンク (GenBank)登録番号、L09137から入手可能である。プライマー対Gの場合は、実施例2で得られたヒト全RNAより配列表の配列番号140および141記載のプライマーおよびTaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1（宝酒造社製）を用いて、添付の標準プロトコールに従って調製した2本鎖DNA増幅断片を鋳型とした。

プライマー対A（増幅断片長約450bp）：配列表の配列番号13および14に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ；

プライマー対B（増幅断片長約250bp）：配列表の配列番号13および15に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ；

プライマー対C（増幅断片長約520bp）：配列表の配列番号13および16に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ；

プライマー対D（増幅断片長約890bp）：配列表の配列番号13および17に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ；

プライマー対E（増幅断片長約130bp）：配列表の配列番号18および19に示される塩基配列を有し、その3'末端3塩基がリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ；

プライマー対F（増幅断片長約220bp）：配列表の配列番号20および19に示される塩基配列を有し、その3'末端3塩基がリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ；

プライマー対G（増幅断片長約320bp）：配列表の配列番号21および22に示される塩基配列を有し、その3'末端3塩基がリボヌクレオチドであるプ

ライマーの組み合わせ。

【0123】

(2) 増幅反応

反応液は、下記のように調製した。

35 mMリン酸カリウムバッファー (pH 7.5)、0.1 mg/ml BSA (牛血清アルブミン)、5%ジメチルスルオキシド、各1.4 mM dNTP混合物、10 mM塩化マグネシウム、それぞれ60 pmolの(1)のプライマー対、ならびに100 ngのpUC19 鑄型DNA、5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60 UのRNase H、反応液の最終容量50  $\mu$ l。

反応条件は以下のとおりである。DNAポリメラーゼおよびRNase H無添加の反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却し、DNAポリメラーゼおよびRNase Hを混合し、55℃、60分間保温した。反応終了後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の8  $\mu$ lを3% ヌシーブ3:1アガロースゲルにて電気泳動を行なった。その結果、いずれのプライマー対においても目的の増幅断片が得られることが確認できた。即ち、本発明の増幅方法において、2本鎖DNAを鑄型として増幅反応を行うことができることを確認した。

【0124】

(3) 増幅産物の制限酵素消化

本発明の増幅方法を用いて得られた増幅断片の制限酵素消化について検討した。鑄型DNAとして、pUC19 プラスミドDNAを用いた。配列表の配列番号13及び14に記載のpUC19 upper (2) NNプライマーおよびpUC19 lower NNプライマーを使用した。なお、該プライマーは、いずれも3'末端の2塩基がリボヌクレオチドである。下記に反応液組成を示す。

【0125】

反応液A: 35 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5)、10 mM塩化マグネシウム、1.4 mM dNTP混合物、0.01% BSA、5% DMSO、2.7%グリセロール、各100 pmolずつのpUC19 upper (2) NNプライマーおよびpUC19 lower NNプライマー、500 n

g の pUC19 DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を  $48\mu\text{l}$  に調製した。

上記反応液を  $98^{\circ}\text{C}$ 、1 分間熱変性処理した後、 $55^{\circ}\text{C}$  に冷却した。次に、60 U の E. coli RNase H および 5.5 U の BcaBEST を添加し、反応液量を  $50\mu\text{l}$  にした。該反応液を  $55^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベーションした。反応終了後、 $90^{\circ}\text{C}$ 、2 分間加熱処理して酵素を失活させた。その反応液を 3 % アガロースゲル電気泳動して、得られた増幅産物を精製した。回収された増幅産物は、 $100\mu\text{l}$  の滅菌蒸留水に再懸濁した。

#### 【0126】

上記 DNA 溶液を使用して制限酵素消化を行った。制限酵素は、AccII (宝酒造社製) および BcnI (宝酒造社製) を使用した。以下に反応液組成を示す。

DNA 溶液  $3\mu\text{l}$ 、 $10\times$  AccII 添付バッファーあるいは  $10\times$  BcnI 添付バッファーを  $1\mu\text{l}$ 、制限酵素 AccII あるいは BcnI を  $1\mu\text{l}$ 、さらに滅菌蒸留水で反応液容量を  $10\mu\text{l}$  に調製した。該反応液を  $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応後、 $10\times$  ローディングバッファー (loading buffer) を  $1.5\mu\text{l}$  加え、そのうちの  $6\mu\text{l}$  を 3 % ヌシーブアガロースゲルで電気泳動した。その結果、AccII および BcnI のいずれの制限酵素においても目的とする制限酵素消化 DNA 断片が得られた。

#### 【0127】

#### (4) 突然変異検出

本発明の増幅方法を用いた突然変異検出について検討した。鋳型として pUC19 を用いた。配列表の配列番号 23 ~ 26 にそれぞれ、pUC19 upper (2) NN-U、pUC19 upper (2) NN-A、pUC19 upper (2) NN-C および pUC19 upper (2) NN-G と称するプライマーおよび配列表の配列番号 14 に pUC19 lower NN プライマーの塩基配列を示した。上記プライマーは、いずれもその 3' 末端の 2 塩基がリボ核酸であるキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。これらのプライマーの組み合わせについて以下に示す。

プライマー対 1 : pUC19 upper (2) NN-U および pUC19 lower NN

プライマー対 2 : pUC19 upper (2) NN-A および pUC19 lower NN

プライマー対 3 : pUC19 upper (2) NN-C および pUC19 lower NN

プライマー対 4 : pUC19 upper (2) NN-G および pUC19 lower NN

#### 【 0 1 2 8 】

反応液は、下記のように調製した。

3 0 m M リン酸カリウムバッファー (p H 7 . 3 ) 、 0 . 0 1 % B S A (牛血清アルブミン) 、 5 % D M S O 、 各 1 m M d N T P 混合物、 8 m M 酢酸マグネシウム、それぞれ 6 0 p m o l の上記のプライマー対および 5 0 n g の鋳型 DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を 4 8  $\mu$  l にした。

#### 【 0 1 2 9 】

上記反応液を 9 8  $^{\circ}$ C、 1 分間熱変性処理後、 5 5  $^{\circ}$ C に冷却した。次に、 5 . 5 U の B c a B E S T DNA ポリメラーゼ、 6 0 U の E . c o l i R N a s e H を添加し、 5 5  $^{\circ}$ C、 6 0 分間保持した。その後、 9 0  $^{\circ}$ C、 2 分間加熱して酵素を失活させた。各反応液 8  $\mu$  l を使用し、 4 % ヌシーブ 3 : 1 アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。その結果、 p U C 1 9 u p p e r ( 2 ) NN の 3 ' 末端が相補的なプライマーの組み合わせのみ目的とする約 4 5 0 b p の増幅断片が検出された。一方、 p U C 1 9 u p p e r ( 2 ) NN の 3 ' 末端がミスマッチのプライマーの組み合わせについてはいずれも増幅断片は、確認できなかった。

#### 【 0 1 3 0 】

##### 実施例 4

##### (1) マイクロチューブでの反応

本発明の増幅方法について反応容量の検討を行った。増幅領域としては、ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を選択した。配列表の配列番号 2 7 及び 2 8 記載の配列を有するプライマーを使用した。なお、該プライマーは、 3 ' 末端の 2 塩基がリボ核酸である。鋳型となる DNA は、あらかじめ R T - P C R 法により得た増幅断片約 7 5 0 b p を使用した。反応容量は、 5 0  $\mu$  l 、 1 0 0  $\mu$  l 、 3 0 0  $\mu$  l 、 および 5 0 0  $\mu$  l になるように調製した。下記に反応液

組成を示す。

反応液A：5×専用バッファー（135mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）、0.5mg/ml BSA、2.5%DMSO）10 $\mu$ l、100mM酢酸マグネシウム 4 $\mu$ l、10mM dNTP混合物 5 $\mu$ l、10 $\mu$ M ATP 10 $\mu$ l、BcaBEST DNAポリメラーゼ（22U/ $\mu$ l）1 $\mu$ l、R NaseH（60U/ $\mu$ l）1 $\mu$ l、および滅菌蒸留水で39 $\mu$ lに調製した。

反応液B：20 $\mu$ MヒトトランスフェリンレセプターSプライマー（配列番号27）および20 $\mu$ MヒトトランスフェリンレセプターAプライマー（配列番号28）をそれぞれ3 $\mu$ l、鋳型DNA約100ngおよび滅菌蒸留水で11 $\mu$ lにした。容量が50 $\mu$ l以上の場合は、上記組成に基づきスケールアップした。

#### 【0131】

増幅反応は、上記B液を98℃、2分間処理した後、55℃、3分間保持した。次に、1500 $\mu$ l容マイクロチューブ中で55℃でプレインキュベーションしたA液に前述のB液を添加し、混和後、55℃で1時間インキュベーションした。反応終了後、氷浴上に移し、反応液8 $\mu$ lを3%アガロースゲル電気泳動した。その結果、いずれの反応容量においても効率よく目的とする約300bpの増幅断片が検出できた。また、鋳型DNAがPCR増幅断片であっても問題なく目的とする増幅断片を得られることを確認した。

#### 【0132】

##### （2）シャーレでの反応

反応容量の増大に伴う反応液の温度不均一を防ぐために、シャーレを使用して検討を行った。増幅領域としては、ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を選択した。プライマーは上記（1）で使用したヒトトランスフェリンレセプターS及びAプライマーを使用した。なお、該プライマーは、3'末端の2塩基がリボ核酸である。鋳型となるDNAは、あらかじめRT-PCR法により得た増幅断片約750bpを使用した。反応容量は、10mlになるように調製した。下記に反応液組成を示す。

反応液A：5×専用バッファー（135mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）、0.5mg/ml BSA、2.5% DMSO） 2000 $\mu$ l、10



0 mM 酢酸マグネシウム 800  $\mu$ l、10 mM dNTP混合物 1000  $\mu$ l および滅菌蒸留水で9.1 mlに調製した。

反応液B：60  $\mu$ M ヒトトランスフェリンレセプターSプライマーおよび60  $\mu$ M ヒトトランスフェリンレセプターAプライマーをそれぞれ200  $\mu$ l、  
鋳型DNA 約10  $\mu$ g および滅菌蒸留水で500  $\mu$ lにした。

反応液C：BcaBEST DNAポリメラーゼ (22 U/ $\mu$ l) 200  $\mu$ l、RNaseH (60 U/ $\mu$ l) 200  $\mu$ l。

#### 【0133】

増幅反応は、上記B液を98℃、1分間処理した後、55℃、3分間保持した。次に、直径60 mmのプラスチックシャーレ中で55℃でプレインキュベーションしたA液に前述のB液を添加し、さらにC液を添加し混和後、55℃で1時間インキュベーションした。反応終了後、氷浴上に移し、反応液8  $\mu$ lを3%アガロースゲル電気泳動した。その結果、10 mlの反応容量であっても目的とする約300 bpの増幅断片が効率よく検出できた。また、鋳型DNAがPCR増幅断片であっても問題なく目的とする増幅断片を得られることを確認した。即ち、多量のDNA断片を必要とするDNAチップ作製において、本発明の方法が従来のPCR法と比較しても好適に使用できることを確認した。

#### 【0134】

##### 実施例5

##### (1) バッファーの種類とRNaseH使用量の関係

バッファーの種類とRNaseHの使用量の関係について検討した。鋳型としてpUC19ベクターに249 bpおよび911 bpのフラグメントをクローニングして得られたプラスミドDNA (pUC19-249およびpUC19-911と称す)を、プライマーとして配列表の配列番号29及び30記載の塩基配列を有するMF2N3 (24) プライマーおよびMR1N3 (24) プライマーを使用した。該プライマーの3'末端3塩基はリボヌクレオチドである。該プライマーの組み合わせによりpUC19-249では約450 bpの、pUC19-911では約1100 bpの増幅断片が得られる。

#### 【0135】

検討するバッファーは、トリス塩酸バッファー、リン酸カリウムバッファー、トリシンバッファー系を選択した。また、RNase Hは、無添加および最終濃度  $0.3 \text{ U} \sim 1.2 \text{ U} / \mu\text{l}$  で検討した。トリス塩酸バッファー系は、 $10 \text{ ng}$  の pUC19-249 あるいは  $200 \text{ ng}$  の pUC19-911、各  $60 \text{ pmol}$  のプライマーおよび  $11 \text{ U} / 50 \mu\text{l}$  反応容量の BcaBEST DNAポリメラーゼ以外は、実施例1(2)と同様に調製した。リン酸カリウムバッファー系についても同様の組成とした。トリシンバッファー系については、最終濃度が  $34 \text{ mM}$  トリシンバッファー ( $\text{pH} 8.7$ )、 $10 \text{ mM}$  塩化カリウム、 $10 \text{ mM}$  硫酸アンモニウム、 $0.01\%$  BSA、 $1\%$  DMSO、 $4 \text{ mM}$  酢酸マグネシウム、 $0.5 \text{ mM}$  dNTP混合物となるように調製した。上記バッファー系について pUC19-249 プラスミド  $10 \text{ ng} / 50 \mu\text{l}$  反応容量、ならびに pUC19-911 プラスミド  $200 \text{ ng} / 50 \mu\text{l}$  反応容量、各  $60 \text{ pmol} / 50 \mu\text{l}$  反応容量のプライマー、各濃度となる RNase H、 $11 \text{ U} / 50 \mu\text{l}$  反応容量の BcaBEST DNAポリメラーゼになるように調製した。

## 【0136】

増幅反応は鋳型となる pUC19-249 あるいは pUC19-911 と各プライマーの混液を  $98^\circ\text{C}$  で1分間熱変性処理後、 $55^\circ\text{C}$  まで冷却した後に残りの反応組成混液を添加し、 $55^\circ\text{C}$  で60分間反応させた。反応終了後、 $4^\circ\text{C}$  に冷却し、 $1/10$  量の  $0.5 \text{ M}$  EDTA を添加して反応を停止させた。その後、各反応液の  $3 \mu\text{l}$  を  $3\%$  ヌシーブ 3:1 アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行った。その結果、pUC19-249 を鋳型とした場合はトリス塩酸バッファー系、リン酸カリウムバッファー系、トリシンバッファー系の順に、pUC19-911 を鋳型とした場合はトリス塩酸バッファー系、トリシンバッファー系、リン酸カリウムバッファー系の順に増幅効率の向上が認められた。さらに、RNase Hについては、無添加では目的の増幅断片は得られなかったが、最終濃度  $0.3 \text{ U} \sim 1.2 \text{ U} / \mu\text{l}$  で用いた場合はいずれも目的の増幅断片が得られた。

## 【0137】

## (2) プライマー量の検討

使用するプライマー量が本発明の増幅方法に与える影響を検討した。反応液は、上記(1)記載の組成のうち、鋳型として pUC19-249 を用いた系を使い、リン酸カリウムバッファー系は 60 U / 50  $\mu$ l 反応の RNase H を、トリス塩酸バッファー系、トリシンバッファー系は 30 U / 50  $\mu$ l 反応の RNase H を用いて行った。プライマーの濃度は 10 pmol ~ 100 pmol / 50  $\mu$ l の範囲で検討した。反応条件および増幅確認は、上記(1)記載と同様にした。

その結果、どの反応バッファー系を用いた場合も、10 pmol ~ 100 pmol / 50  $\mu$ l の範囲で目的とする増幅断片が確認できた。

【0138】

## (3) 反応バッファーの pH の影響

反応液の pH が本発明の増幅方法に与える影響について検討した。反応液は、上記(2)記載の組成と同様にした。pH は、リン酸カリウムバッファー系は、pH 7.0 ~ 8.0 の範囲で、トリシンバッファー系は、pH 7.5 ~ 9.2 の範囲で、トリス塩酸バッファー系は、pH 7.5 ~ 9.0 の範囲で検討した。反応条件および増幅確認は、上記(1)記載と同様にした。その結果、各々のバッファー系で用いた pH の範囲において、目的とする増幅断片が確認できた。

【0139】

## (4) 添加剤の効果

上記(3)記載のリン酸バッファー系 (pH 7.5) の反応液組成で、ジメチルスルホキシド (DMSO) の添加効果を検討した。また、ポリアミンの添加効果についても検討した。DMSO の添加量は、無添加 ~ 10 % の範囲で検討した。一方、ポリアミンとしては、スベルミン 4 塩酸塩 (シグマ社製)、スベルミン 3 塩酸塩 (シグマ社製)、アセチルプトレスシン (ナカライ社製)、プトレスシン 2 塩酸塩 (ナカライ社製)、トリメチレンジアミン (ナカライ社製)、プロピレンジアミン (ナカライ社製)、ジアミノメタン 2 塩酸塩 (ナカライ社製) を使用した。添加量は、プロピレンジアミンおよびトリメチレンジアミンは、無添加 ~ 2 % の範囲で、それ以外のポリアミンは、無添加 ~ 5 mM の範囲で行った。

反応条件および増幅確認は、上記（１）記載の方法と同様にした。その結果、DMSOは、無添加～５％、スペルミン４塩酸塩とスペルミジンは、無添加～２００μM、アセチルプトレスシンとプトレスシン２塩酸塩は、４０μM～４０mM、トリメチレンジアミンは、０．００２％～０．０２％、プロピレンジアミンは、０．０００１％～０．０１％、そしてジアミノメタン２塩酸塩は、０．１μM～１０μMの範囲で、目的のDNA断片が効率よく増幅されることが確認できた。

#### 【0140】

##### （５）マグネシウム塩の種類の検討

本発明の増幅方法に対するマグネシウム塩の種類について検討した。鋳型としてpUC19DNAを、プライマーとして配列表の配列番号３１および１４記載の塩基配列を有するpUC19 upper NN249プライマーおよびpUC19 lower NNプライマーを使用した。該プライマー対で、約２２５bpの増幅断片が得られる。マグネシウム塩は、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムおよび硫酸マグネシウムを使用した。以下に反応液組成を示す。

３５mMリン酸カリウムバッファー（pH7.3）、最終濃度８mMの塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムまたは硫酸マグネシウム、最終濃度１．０mM dNTP混合物、５０ng pUC19DNA、各６０pmolの上記プライマー対、６０U RNaseH、５．５U BcaBEST DNAポリメラーゼ、および滅菌蒸留水で反応容量５０μl。反応条件および増幅確認は、上記（３）と同様にして行った。その結果、いずれのマグネシウム塩においても目的の増幅断片が確認できた。

#### 【0141】

##### （６）マグネシウム濃度、およびdNTP濃度の検討

本発明の増幅方法に対するマグネシウム濃度、およびdNTP濃度について検討した。反応液組成は、２５ngのpUC19 DNA、種々の濃度のマグネシウム、dNTP以外は上記（５）記載のものと同様にした。反応条件および増幅確認は上記（１）と同様にして行った。

最終濃度１mMのdNTPで固定した反応系では、マグネシウム濃度が最終濃

度 6 mM ~ 1 0 mM の範囲で目的の増幅断片が得られ、また、最終濃度 8 mM のマグネシウムで固定した反応系では d N T P 濃度が最終濃度 0. 6 ~ 1. 2 mM の範囲で目的の増幅断片が得られた。さらに、最終濃度 0. 5 mM の d N T P で固定した反応系では、マグネシウム濃度が最終濃度 2 mM ~ 6 mM の範囲で目的の増幅断片が得られ、最終濃度 4 mM のマグネシウムで固定した反応系では d N T P 濃度が最終濃度 0. 2 ~ 0. 8 mM の範囲で目的の増幅断片が得られた。

## 【 0 1 4 2 】

( 7 ) リン酸カリウムバッファー濃度、およびトリシンバッファー濃度変化と反応性の検討

本発明の増幅方法に対するリン酸カリウムバッファー濃度、およびトリシンバッファー濃度について検討した。反応液組成は、最終濃度 2 0 ~ 5 0 mM リン酸カリウムバッファー、最終濃度 2 2 ~ 4 6 mM トリシンバッファーとする以外は上記 ( 1 ) 記載の p U C 1 9 - 2 4 9 を鋳型とした反応と同様にした。反応条件および増幅確認も上記 ( 1 ) と同様にして行った。その結果、リン酸カリウムバッファー、トリシンバッファーの濃度が、それぞれ最終濃度 2 0 ~ 5 0 mM、最終濃度 2 2 ~ 4 6 mM の範囲で目的の増幅断片が得られた。

## 【 0 1 4 3 】

( 8 ) B c a B E S T DNA ポリメラーゼ濃度の検討

本発明の増幅方法に対する B c a B E S T DNA ポリメラーゼ濃度について検討した。反応液組成はリン酸カリウムバッファー、トリシンバッファー系を用い、B c a B E S T DNA ポリメラーゼを 1 ~ 2 2 U / 5 0  $\mu$  l 反応容量の範囲で使用する以外は上記 ( 1 ) 記載の p U C 1 9 - 2 4 9 を鋳型とした反応と同様にした。反応条件および増幅確認も上記 ( 1 ) と同様にして行った。その結果、B c a B E S T DNA ポリメラーゼ量が 1 ~ 2 2 U / 5 0  $\mu$  l の範囲において目的の増幅断片が得られた。

## 【 0 1 4 4 】

## 実施例 6

## P C R 法との比較

本発明の増幅方法について P C R 法との比較を行った。鋳型は、p U C 1 9 プ

ラスミドDNAのマルチクローニングサイトに約150bpおよび約250bpのDNA断片を挿入したものをを用いた。該鑄型は、以下のようにして調製した。

配列表の配列番号32、33および34記載の配列を有するpUC19 upper 150 PCRプライマー、pUC19 upper 249 PCRプライマー、pUC19 lower PCRプライマーを使用し、pUC19プラスミドDNA100pgを鑄型としてPCR反応を行った。pUC19 upper 150プライマーおよびpUC19 lower NNプライマーの組み合わせでは約150bpの増幅断片、pUC19 upper 249プライマーおよびpUC19 lower NNプライマーの組み合わせでは、約250bpの増幅断片が得られた。該増幅断片は、マイクロコンー100で精製後、DNA blunting kit（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、pUC19プラスミドのHincIIサイトにサブクローニングした。上記増幅断片の挿入されたプラスミドを用いて、大腸菌JM109を形質転換した。該形質転換体を培養し、その菌体よりQIAGEN plasmid mini kit（キアゲン社製）を用いてDNA挿入プラスミドを精製した。このDNA挿入プラスミドを鑄型として使用した。

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号35及び36に示した。なお、本発明の増幅方法に用いるプライマーは、3'末端3塩基がリボヌクレオチドである。以下に反応液組成を示す。

27mMリン酸バッファー（pH7.3）、0.01%BSA（牛血清アルブミン）、5%DMSO、各1mM dNTP混合物、8mM酢酸マグネシウム、それぞれ60pmolの上記のプライマー対および1ngの鑄型DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を48μlにした。

上記反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60UのE. coli RNase Hを添加し、55℃、60分間保持した。その後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。各反応液3μlを4%ヌシーブ3:1アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。

【0145】

一方、対照としてPCR法での増幅を行った。反応は、PCR Amplification kit（宝酒造社製）を使用し、配列表の配列番号37及び38に示したプライマーを各10 pmolずつ、1 ngの鋳型DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を50  $\mu$ lにした。反応条件は、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 40秒を1サイクルとして25サイクル行った。反応終了後、各反応液3  $\mu$ lを4% ヌシーブ3:1アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。その結果、挿入断片が、150 bpおよび249 bpのいずれのプラスミドを鋳型とした場合においてもPCR法より本発明の増幅方法の方が目的の増幅断片が多く確認できた。さらに増幅産物量を数値化するために、上記各反応液20  $\mu$ lをマイクロコンー100にて精製し、その量をベックマンDU-640分光光度計（ベックマン社製）にて定量した。すると本発明の増幅方法の方が挿入断片が150 bpのプラスミドを鋳型とした場合は約60倍、挿入断片が250 bpの場合は約40倍多く得られることが確認できた。このことから、多量のDNA断片を必要とするDNAチップにおいて、本発明の方法が従来のPCR法と比較しても好適に使用できることを確認した。

【0146】

実施例7

(1) RNAプローブの調製

本発明の増幅方法により得られた増幅断片の検出法について検討した。検出用プローブとして、リボヌクレオチドで構成され、該プローブの両端のリボヌクレオチドに異なる2つの蛍光物質の結合したものを調製した。検出用RNAプローブは、DNA合成機（アプライド バイオシステム社製）を用いて合成した。その塩基配列を配列表の配列番号39に示す。また、蛍光標識は、5'末端が、6-FAM（グレーンリサーチ社製）、3'末端が、TAMRA（グレーンリサーチ社製）を使用した。

【0147】

(2) 増幅反応および検出

鋳型として、0.1および1 ngのpUC19 DNAを使用した。プライマーは、配列表の配列番号40および16に記載の配列を有するpUC19 upp

er 150 2NプライマーおよびpUC19 lower 542 2Nプライマーで、該プライマーの3'末端2塩基が、リボヌクレオチドである。

反応液組成を以下に示す。

27 mMリン酸バッファー (pH 7.3)、0.01% BSA、5% DMSO、各1 mM dNTP混合物、8 mM 酢酸マグネシウム、それぞれ60 pmolの上記のプライマー対および0.1または1 ngの鋳型DNA、上記RNAプローブ0.1  $\mu$ gおよび滅菌蒸留水で反応液容量を48  $\mu$ lにした。また対照として、鋳型DNAなしのものも調製した。

上記反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、22 UのBcaBEST DNAポリメラーゼまたは滅菌水、および60 UのE. coli RNase Hを添加し、55℃、60分間保持した。その後、10% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、ナカライ社製) を5  $\mu$ l添加し、酵素を失活させた。各反応液50  $\mu$ lを滅菌水で等量希釈し、マイクロプレートに移した。検出は、イメージアナライザーFM BIO II Multi-View (宝酒造社製) を用いて励起波長505 nmで行った。その結果、BcaBEST DNAポリメラーゼ無添加では、どの鋳型量でも蛍光シグナルは検出されなかった。また、BcaBEST DNAポリメラーゼ添加時においても鋳型DNA量がなしの場合も蛍光シグナルは検出されなかった。一方、鋳型DNAが0.1 ngあるいは1 ngの場合、いずれも蛍光シグナルを検出することができた。また、同時に0.00003%のエチジウムブロマイドを含む3%アガロース電気泳動においてもBcaBEST DNAポリメラーゼ存在下、鋳型DNA量が0.1 ngおよび1 ngの場合のみ目的とする約190 bpの増幅断片が確認できた。即ち、RNAプローブによる検出法と従来の電気泳動による検出法において同じ結果が得られた。このように、本発明の増幅方法で得られた増幅断片をRNAプローブを用いて検出する方法を確立した。

【0148】

#### 実施例 8

本発明の方法で一方のプライマーをデオキシヌクレオチドにした場合について検討した。プライマーは、配列表の配列番号41記載の配列を有するMR1N3



(30)と配列表の配列番号42記載の配列を有するM4プライマー(宝酒造社製)を使用した。なお、MR1N3プライマーは、3'末端3塩基がリボヌクレオチドである。以下に反応液組成を示す。

27mM リン酸バッファー(pH7.3)、0.01% BSA(牛血清アルブミン)、5% DMSO、各1mM dNTP混合物、8mM 酢酸マグネシウム、それぞれ30pmolの上記のプライマー対および1ngの鋳型DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を24 $\mu$ lにした。

#### 【0149】

上記反応液を98℃、2分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、30UのE. coli RNase Hを添加し、反応容量を25 $\mu$ lにした。該反応液を55℃、60分間保持した。その後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。各反応液5 $\mu$ lを4% ヌシープ3:1アガロースゲルにて電気泳動を行なった。その結果、目的の増幅断片が確認できた。

#### 【0150】

#### 実施例9

本発明の方法を用いて腸管出血性大腸菌O-157検出を行った。

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号43~46に示した。なお、該プライマーは、3'末端3塩基がリボヌクレオチドである。また、配列番号40と41の組み合わせは、O-157のベロ毒素1をコードする配列を、配列番号42と43の組み合わせは、ベロ毒素2をコードする配列を検出するように、臨床と微生物、第18巻、第4号、507~513頁(1991)記載のプライマーを構築した。鋳型は、ATCC登録番号43895の腸管出血性大腸菌O-157を培養したものを集菌し、適当な細胞数に滅菌水で懸濁した後、98℃で10分間処理した熱抽出物を使用した。以下に反応液組成を示す。

27mM リン酸バッファー(pH7.3)、0.01% BSA(牛血清アルブミン)、5% DMSO、各1mM dNTP混合物、8mM 酢酸マグネシウム、それぞれ60pmolの上記のプライマー対、 $10^4 \sim 10^6$ 細胞数に相当する鋳型DNA(熱抽出物)、および滅菌蒸留水で反応液容量を48 $\mu$ lにした。

上記反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60 UのE. coli RNase Hを添加し、55℃、60分間保持した。その後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。各反応液3 μlを4% ヌシーブ3:1アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。その結果、いずれのプライマー対でも104細胞数相当のDNAを鋳型として、O-157ペロ毒素1および2を検出することができ、本発明の方法が、病毒性細菌の検出方法として利用できることを確認した。

# 【0151】

## 実施例10

本発明の方法による長鎖DNA断片の増幅について検討した。鋳型となる2本鎖DNAは、以下のようにして調製した。まず、胃正常部組織由来mRNAから常法によりUni-ZAP XRベクター（ストラタジーン社製）を用いてライブラリーを構築した。次にそのライブラリーをスクリーニングして、インサート部が約2.1 kbpおよび約4.3 kbpのクローンを用いてインビトロエキシジョンして得られたpBluescript SK（-）ファージベクターを選択した。さらに、該プラスミドを鋳型として、配列表の配列番号47及び48記載の配列を有するMCR-FプライマーおよびMCR-Rプライマー、PCR Amplification Kit（宝酒造社製）を用いて約2.2 kbpおよび約4.4 kbpの増幅断片を得た。このPCR断片を本発明の増幅方法の鋳型とした。使用するプライマーは、配列表の配列番号49及び50に記載の配列を有するMF2N3（24）プライマーおよびMR1N3（24）プライマーを使用し、該プライマーは3'末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応液組成を以下に示す。

28 mM リン酸バッファー（pH7.5）、0.01% BSA（牛血清アルブミン）、1% DMSO、各0.5 mM dNTP混合物、4 mM 酢酸マグネシウム、各30 pmolの上記のプライマー対、0.2 mM プトレスシンおよび滅菌水を加え、24.25 μlにした。該反応液を92℃で2分間処理して、55℃に冷却した後、30 UのRNase Hおよび5.5 UのBcaBEST D

NAポリメラーゼを加え、反応容量を25 $\mu$ lにし、1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、0.5M EDTA溶液を2.5 $\mu$ l加えて反応を停止させた。その後、該溶液5 $\mu$ lを1%アガロース電気泳動に供した。その結果、本発明の方法で約2.2kbpあるいは約4.4kbpの増幅断片を得ることができ、本方法で長鎖DNA断片を増幅できることを確認した。

## 【0152】

## 実施例11

本発明の増幅方法で増幅した約400bpの $\lambda$ DNA断片とPCRで増幅した300bpと1000bpの $\lambda$ DNA断片をスポットしたDNAマイクロアレイを作製した。 $\lambda$ DNAのヌクレオチド配列はジーンバンク(GenBank)登録番号、V00636、J02459、M17233及びX00906のより入手可能である。なお、本発明の増幅方法の反応液は、下記のように調製した。

34mM トリシン塩酸バッファー(pH8.7)、10mM塩化カリウム、10mM硫酸アンモニウム、0.01% BSA(牛血清アルブミン)、1% ジメチルスルオキシド、4mM酢酸マグネシウム、各0.5mM dNTP混合物、それぞれ500pmolのプライマー対、ならびに鋳型として100ngのPCR増幅産物、110UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、300UのclonedRNaseH、反応液の最終容量は500 $\mu$ l。上記反応液を均一に混合し、55℃で60分間保温した後、90℃で2分間加熱して酵素を失活させた。この溶液を以下の工程に使用した。また、スポットしたDNA断片は次の通りである。

## 【0153】

1. サンプル： $\lambda$ DNAを鋳型にした、配列表の配列番号51及び52に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるPCR増幅産物(300bp)をpUC19ベクターにサブクローニング後、実施例10記載のMCR-F及びMCR-RプライマーでPCR増幅したものを鋳型にして、配列表の配列番号53及び54に記載の配列を有するプライマー(該プライマーの3'末端2塩基がリボヌクレオチドである)を使用して本発明の増幅方法により増幅したもの(増幅サイズは約400bp)。スポットする際のDNA溶液としては、反応液原液、

炭酸バッファーでそれぞれ2倍、4倍、8倍、16倍希釈したもの（希釈溶液の炭酸バッファー濃度はすべて50 mM）で計5種類。

2. サンプル：上記1で増幅したDNA断片をマイクロコン-100（宝酒造社製）で処理して50 mM 炭酸バッファーで次の0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計5種類。

3. 陽性コントロール：上記1.で調製した300 bpのPCR増幅産物をマイクロコン-100で処理して50 mM 炭酸バッファーで次の0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計5種類。

4. 陽性コントロール： $\lambda$  DNAを鋳型にした、配列表の配列番号55及び56に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるPCR増幅産物（1000 bp）をマイクロコン-100で処理して50 mM 炭酸バッファーで次の0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計4種類。

5. 陰性コントロール： $\lambda$  DNAを鋳型にした、配列表の配列番号55及び57に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるPCR増幅産物（300 bp）をpUC19ベクターにサブクローニング後、配列表の配列番号47および48に記載の配列を有するプライマーでPCR増幅したものを鋳型にして、配列表の配列番号53と54に記載の配列を有するプライマーで本発明の増幅方法により増幅したもの（増幅サイズは約400 bp）。スポットする際のDNA溶液としては、反応液原液、炭酸バッファーでそれぞれ2倍、4倍、8倍、16倍希釈したもの（希釈溶液の炭酸バッファー濃度はすべて50 mM）で計5種類。

6. 陰性コントロール：上記5で得られたDNA断片をマイクロコン-100で処理して50 mM 炭酸バッファーで次の0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計5種類。

【0154】

調製した各DNA溶液をDNAチップ作製装置（Genetic Micro

s y s t e m s : G M S 社製) を用いてアミノ基導入スライドガラス(松浪硝子工業社製)にスポットし、UV照射により固定した。スライドを0.2% SDS、次いで蒸留水で洗浄、乾燥してDNAアレイとした。

#### 【0155】

また、上記1. で調製した300bpのPCR増幅産物をLabel IT Cy5<sup>R</sup> Labeling Kit (宝酒造社製)によりCy5標識してプローブとした。次に、IntelliGene (宝酒造社製)の取扱説明書に記載のプレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーションを行った。まず上記DNAアレイを室温にて2時間プレハイブリダイゼーション処理を行った後、変性したCy5標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液をDNAアレイに滴下し、カバーガラスをかけて周囲をフィルムで密封した。これを65℃で13時間保持した後、カバーガラスを除いて、65℃で2×SSC溶液で5分間、次に65℃で0.2×SSCおよび0.1% SDSを含む溶液で5分間、最後に室温で0.2×SSC溶液で5分間洗浄し、風乾した。これをマイクロアレイスキャナー(GMS社)にかけて各スポットの蛍光シグナルを解析した。この結果、PCR法で増幅した断片(上記3、4の陽性コントロール)および、本発明の方法で増幅した断片(上記1、2のサンプル)をスポットした位置のいずれにおいても蛍光シグナルが確認できた。また、シグナルの強さはサンプル2>陽性コントロール4>サンプル1>陽性コントロール3であった。一方、陰性コントロールの5、6ではシグナルは全く認められなかった。このことから、本発明の方法で増幅したDNA断片は、未精製でもあるいは精製後でもDNAチップを作製するための固定化用DNA断片として好適に使用できることを確認した。

#### 【0156】

##### 実施例12

(i) PCR増幅断片を鋳型とする場合の本発明の方法に使用するプライマーデザインについて検討した。まず、配列表の配列番号58~63記載の配列を有する、R1-S1プライマーを、R1-A3プライマー、R2-S1プライマー、R2-A3プライマー、R3-S1プライマー及びR3-A3プライマーを常法

により合成した。各プライマーの構造について以下に示す。

(i) R1-S1プライマー：5'末端から7塩基のスペーサー配列、17塩基のM13RV配列（またはRV配列）は、M13RVプライマー（宝酒造社製）のヌクレオチド配列をいう）及び20塩基のλDNA特異的PCR用センスプライマー配列；

(ii) R1-A3プライマー：5'末端から7塩基のスペーサー配列、17塩基のM13RV配列及び20塩基のλDNA特異的PCR用アンチセンスプライマー配列；

(iii) R2-S1プライマー：5'末端から25塩基のスペーサー配列、17塩基のM13RV配列及び20塩基のλDNA特異的PCR用センスプライマー配列；

(iv) R2-A3プライマー：5'末端から25塩基のスペーサー配列、17塩基のM13RV配列及び20塩基のλDNA特異的PCR用アンチセンスプライマー配列；

(v) R3-S1プライマー：5'末端から58塩基のスペーサー配列、17塩基のM13RV配列及び20塩基のλDNA特異的PCR用センスプライマー配列；

(vi) R3-A3プライマー：5'末端から58塩基のスペーサー配列、17塩基のM13RV配列及び20塩基のλDNA特異的PCR用アンチセンスプライマー配列。

なお、M13RV 20merは、17塩基のM13RV配列及び5'側に3塩基の計20塩基の配列を有する。従って、M13RV 20merを用いて本発明の方法を実施した場合、上記プライマーのスペーサー配列の長さは、それぞれ4塩基、22塩基、55塩基となる。さらに、対照として、上記プライマーのスペーサー配列のないプライマーも作成した。

#### 【0157】

上記プライマー対、例えば、R1-S1プライマー／R1-A3プライマーを用いると348bpの増幅断片が得られる。この増幅断片の両端7塩基がスペーサー部分であり、その内側にRV配列、さらに内側にλDNAの配列を含む。

同様に、R2-S1プライマー／R2-A3プライマーを用いると増幅断片の両端25塩基がスパーサー部分である384bpの増幅断片が得られ、R3-S1プライマー／R3-A3プライマーを用いると増幅断片の両端58塩基がスパーサー部分である450bpの増幅断片が得られる。一方、対照用プライマーを用いた増幅断片は、スパーサー部分を有さない。これらのPCR増幅断片を鋳型として以下の検討を行った。

# 【0158】

本実施例においては、配列表の配列番号64及び65記載の配列を有するM13RV-2N 17merプライマー、M13RV-2N 20merプライマーの2種類を用いた。なお、該プライマーは、3'末端の2塩基がリボヌクレオチドである。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー 20μM、約20ngの上記鋳型及び0.01%プロピレンジアミンの混合液5μlを98℃ 2分間変性後、55℃まで冷却した。その後、34mM トリシンバッファー（pH8.7）、10mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、0.01% BSA、1% DMSO、4mM 酢酸マグネシウム、0.5mM dNTP、1UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、15UのRNaseHを添加し、最終反応容量を25μlにした。該反応液は、55℃で1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、0.5M EDTA溶液2.5μlを添加して反応を停止し、該反応液3μlを3% ヌシーブ 3:1アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果、M13RV-2N 17merを用いた場合は、スパーサー配列が25mer、7mer、58mer、スパーサー配列なしの順に、M13RV-2N 20merを用いた場合は、スパーサー配列が22mer、4mer、55mer、スパーサー配列なしの順に増幅効率がよいことが確認できた。また、上記（i）から（vi）のプライマーのM13RV配列をM13M4配列に変更した場合でも、スパーサー配列と増幅効率の関係は同じ傾向を示した。即ち、PCR増幅断片のような直鎖DNA断片を鋳型とする場合、スパーサー配列（部分）ができるように本発明の方法に用いるプライマーをデザインすることが増幅効率向上につながることを確認した。

（2）反応温度を上げた場合の核酸配列増幅方法について、GC含量の高い鋳型

の増幅について検討した。まず、ジーンバンク(GenBank)登録番号、AA789328のCDC2-related protein kinase PISSLRE遺伝子領域 307bp (GC含量: 62.5%) について配列表の配列番号66及び67に記載のPCR増幅用プライマーを、またジーンバンク(GenBank)登録番号、AA706022のType II cytoskeletal 1 keratin遺伝子領域 284bp (GC含量: 61.3%) について配列表の配列番号68及び69に記載のPCR増幅用プライマーをそれぞれ作製した。これらのプライマーを用いて、市販のDNA断片(リサーチジェネティックス社製)を鋳型としてPCR増幅した。上記プライマー対を用いることにより、得られたPCR増幅断片は、両端にスペーサー配列及びM13RV配列を有する。これを本発明の鋳型とした。

## 【0159】

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号64記載の配列を有するM13RV-2N 17merプライマーまたは配列表の配列番号65記載の配列を有するM13RV-2N 20merプライマーを用いた。なお、該プライマーは、いずれも3'末端の2塩基がリボヌクレオチドである。反応は以下のように行った。即ち前述のプライマー 100pmol、20ngの鋳型及び0.01%プロピレンジアミンの混合液10 $\mu$ lを98℃ 2分間変性後、55℃または、60℃まで冷却した。その後、34mM トリシンバッファー(pH8.7)、10mM KCl、10mM 硫酸アンモニウム、0.01% BSA、1% DMSO、4mM 酢酸マグネシウム、0.5mM dNTP、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、30UのRNaseH を添加して、最終反応容量を50 $\mu$ lにした。該反応液を55℃または60℃で1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、該反応液3 $\mu$ lを3%アガロース電気泳動に供した。その結果を以下の表1に示す。

## 【0160】



【表 1】

表1

反応温度	使用プライマー	遺伝子名及び増幅結果	
		CDC2-related	Type II cytoskeletal
55℃	M13RV-2N 17mer	++	++
	M13RV-2N 20mer	++	++
60℃	M13RV-2N 17mer	+	+
	M13RV-2N 20mer	++++	++++

+～++++：増幅の程度を4段階で示す。

—：増幅はみられない。

## 【0161】

表1に示したように、反応温度を高くすること（55℃から60℃）、さらに60℃で反応する場合、55℃反応時の至適プライマーよりT<sub>m</sub>値の高いプライマーを使用することにより、GC含量の高い鋳型の場合でも効率よく目的とする領域を増幅することができた。

## 【0162】

（3）反応温度が高い場合の核酸配列の増幅方法について増幅断片長と増幅産物の関係を検討した。まず、λ DNA（宝酒造社製）の800bp領域を増幅できる配列表の配列番号70及び71記載の配列を有するプライマーと400bp領域を増幅できる配列表の配列番号72及び73記載の配列を有するプライマーを常法により合成した。このプライマー対を用いて、λ DNAを鋳型としてPCRを行い増幅断片を得た。さらに、実施例5（1）に記載のpUC19-911プラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号74及び75記載の配列を有するMF2（24）PCRプライマー及びMR1（24）PCRプライマーを用いて増幅した約1.1kbpの増幅断片も調製した。上記プライマー対を用いることにより、得られたPCR増幅断片は、両端にスパーサー配列及びM13RVあるいはM4配列を有する。これを本発明の鋳型とした。

## 【0163】

次に本実施例において使用するプライマーは、上記（２）記載のM13RV-2N 17merプライマーまたはM13RV-2N 20merプライマーを用いた。なお、該プライマーは、いずれも3'末端の2塩基がリボヌクレオチドである。さらに、約1kbp領域の増幅に関しては、配列表の配列番号76記載の配列を有するM13M4-3N 20merプライマーと配列表の配列番号77記載のM13RV-3N 20merプライマーの組み合わせ及び配列表の配列番号78及び79記載の配列を有するM13M4-3N 24merプライマー及びM13RV-3N 24merプライマーの組み合わせで行った。なお、該プライマーは、いずれも3'末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー 100pmol、約20ngの鋳型及び0.01%プロピレンジアミンの混合液10 $\mu$ lを98℃ 2分間変性後、55℃または60℃まで冷却した。その後、34mM トリシンバッファー（pH8.7）、10mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、0.01% BSA、1% DMSO、4mM 酢酸マグネシウム、0.5mM dNTP、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、30UのRNaseHを添加し、最終反応容量を50 $\mu$ lにした。該反応液を55℃または60℃で1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、0.5M EDTA溶液5 $\mu$ lを添加して反応を停止し、該反応液3 $\mu$ lを3% ヌシーブ3:1アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果を表2及び表3に示す。

【0164】

【表 2】

表 2

反応温度	使用プライマー	増幅鎖長及び結果	
		400bp	800bp
55℃	M13RV-2N 17mer	++	++
	M13RV-2N 20mer	++	++
60℃	M13RV-2N 17mer	+	+
	M13RV-2N 20mer	++++	++++

+～++++ : 増幅の程度を4段階で示す。

— : 増幅はみられない。

## 【0165】

表 2 に示したように、増幅に使用するプライマーの長さを 17mer から 20mer にし、さらに反応温度を 55℃ から 60℃ に高くすることにより、400bp 及び 800bp の増幅領域において増幅断片を効率よく得ることができた。

## 【0166】

【表 3】

表 3

反応温度	使用プライマー	増幅鎖長及び結果
		1034bp
55℃	M13RV-3N 20mer & M13M4-3N 20mer	++
	M13RV-3N 24mer & M13M4-3N 24mer	++
65℃	M13RV-3N 20mer & M13M4-3N 20mer	+
	M13RV-3N 24mer & M13M4-3N 24mer	++++

+～++++ : 増幅の程度を4段階で示す。

— : 増幅はみられない。

## 【0167】

さらに、表 3 に示したように増幅に使用するプライマーの長さを 20mer か

ら24merにし、さらに反応温度を55℃から65℃に高くすることにより、約1kbpの増幅領域において増幅断片を効率よく得ることができた。また、実施例10に示したような長鎖DNA断片の増幅においても、使用するプライマーを長くし、反応温度を上げることにより上記と同様の結果が得られ、約2kbp以上の増幅領域の場合でも増幅効率が向上することが確認できた。

## 【0168】

## 実施例13

(1) 本発明の方法についてBcaBEST DNAポリメラーゼ以外の耐熱性DNAポリメラーゼを使用した場合について検討した。耐熱性DNAポリメラーゼとしてBst DNAポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）を使用した。まず、配列表の配列番号80及び81記載の配列を有する5' IDプライマー及び3' IDプライマーを常法により合成した。このプライマー対を用いて、市販のcyclin A遺伝子のDNA断片（リサーチジェネティック社製）を鋳型としてPCRを行い、約300bpの増幅断片を得た。上記プライマー対を用いることにより、得られたPCR増幅断片は、両端にM13RV配列を有する。これを本発明の鋳型とした。

## 【0169】

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号64記載の配列を有するM13RV-2N 17merプライマーを用いた。なお、該プライマーは、3'末端の2塩基がリボヌクレオチドである。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー 20  $\mu$ M、約20ngの上記鋳型及び0.01%プロピレンジアミンの混合液10  $\mu$ lを98℃ 2分間変性後、55℃まで冷却した。その後、34mM トリシンバッファー（pH8.7）、10mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、0.01% BSA、1% DMSO、4mM 酢酸マグネシウム、0.5mM dNTP、4U、8U、12U及び16UのBst DNAポリメラーゼ、30UのRNase Hを添加し、最終反応容量を50  $\mu$ lにした。また、対照として、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを使用する以外は上記反応液組成と同じものを調製した。該反応液は、55℃で1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、0.5M EDTA

溶液  $5\mu\text{l}$  を添加して反応を停止し、該反応液  $3\mu\text{l}$  を 3% ヌシープ 3:1 アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果、いずれのユニット数の Bst DNA ポリメラーゼを使用した場合でも目的の増幅断片を得ることができた。従って、本発明の方法において、耐熱性 DNA ポリメラーゼが好適に使用できることを確認した。

## 【0170】

（2）本発明の方法について常温性 DNA ポリメラーゼを使用した場合について検討した。常温性 DNA ポリメラーゼとして 5'→3' エキソ活性（-）クレノウ断片（宝酒造社製）を使用した。本発明の方法に用いる鋳型 DNA は、上記（1）で調製したものを使用した。

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号 82 記載の配列を有する M13RV-2N 16mer プライマーを用いた。なお、該プライマーは、3' 末端の 2 塩基がリボヌクレオチドである。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー  $20\mu\text{M}$ 、約  $20\text{ng}$  の上記鋳型及び 0.01% プロピレンジアミンの混合液  $10\mu\text{l}$  を  $98^{\circ}\text{C}$  2 分間変性後、 $40^{\circ}\text{C}$  まで冷却した。その後、 $34\text{mM}$  トリシンバッファー（pH 8.7）、 $10\text{mM}$  塩化カリウム、 $10\text{mM}$  硫酸アンモニウム、0.01% BSA、1% DMSO、 $4\text{mM}$  酢酸マグネシウム、 $0.5\text{mM}$  dNTP、0U、2U、4U、6U 及び 8U のクレノウ断片、30U の RNase H を添加し、最終反応容量を  $50\mu\text{l}$  にした。該反応液は、 $40^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保持した。反応終了後、 $4^{\circ}\text{C}$  に冷却し、 $0.5\text{M}$  EDTA 溶液  $5\mu\text{l}$  を添加して反応を停止し、該反応液  $3\mu\text{l}$  を 3% ヌシープ 3:1 アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果、クレノウ断片が存在しない場合を除いて、いずれのユニット数の場合でも目的の増幅断片を得ることができた。従って、本発明の方法において、常温性 DNA ポリメラーゼが好適に使用できることを確認した。

## 【0171】

## 実施例 14

本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーについて検討した。鋳型 DNA 及びプライマー合成は、実施例 1（1）記載の方法に従った。本実

施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す：

プライマー対 1：配列表の配列番号 2 および 3 に示される塩基配列を有し、その全体がすべてデオキシリボヌクレオチドで構築されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 2：配列表の配列番号 8 3 及び 8 4 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 6、7 個めがリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ。

プライマー対 3：配列表の配列番号 8 5 及び 8 6 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 5、6 個めがリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ。

プライマー対 4：配列表の配列番号 8 7 及び 8 8 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 4、5 個めがリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ。

プライマー対 5：配列表の配列番号 8 9 及び 9 0 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 3、4 個めがリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ。

プライマー対 6：配列表の配列番号 9 1 及び 9 2 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 2、3 個めがリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ。

プライマー対 7：配列表の配列番号 9 3 及び 9 4 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 1、2 個めがリボヌクレオチドであるプライマーの組み合わせ。

プライマー対 8：配列表の配列番号 9 1 及び 9 2 に示される塩基配列を有し、それぞれの 3' 末端から 2、3 個めがリボヌクレオチドであり、かつ 3' 末端から 3 個めのリボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合であるプライマーの組み合わせ。

#### 【 0 1 7 2 】

増幅条件及び検出方法については、実施例 1（2）及び（3）記載の方法に準じて行った。その結果、プライマー対 2～8 のいずれにおいても目的の長さの増幅断片を確認することができた。また、プライマー対 2～7 については、3' 末

端のデオキシリボヌクレオチドの数が減少するに従って増幅産物量が多くなり、特に3'末端にデオキシリボヌクレオチドがないプライマー対7において最も増幅産物量が多くなることを確認した。一方、プライマー対1については、増幅断片は確認できなかった。さらに、プライマー対6と8のいずれにおいても目的とする増幅断片が確認できたことから、プライマー中に存在するリボヌクレオチドが修飾リボヌクレオチドあるいは未修飾リボヌクレオチドのいずれであっても本発明の方法に好適に使用できることを確認した。

## 【0173】

## 実施例15

(1) 本発明の方法においてバッファーの種類を変えて検討した。本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号95及び96記載の配列を有する $\lambda$  DNA増幅用のプライマーを用いた。なお、該プライマーは、3'末端の3残基がリボヌクレオチドである。反応は、以下のように行った。すなわち、各120 pmolの上記プライマー、0.01%プロピレンジアミン水溶液、10 ngまたは1 ngの鋳型DNAの混合液10  $\mu$  lを98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で冷却し、プライマーを鋳型DNAにアニールさせた。なお、該鋳型は、 $\lambda$  DNA（宝酒造社製）を鋳型とし、配列表の配列番号97及び98記載のプライマーを使用したPCRによって得られた増幅産物（1005 bp）をSuprec 02（宝酒造社製）で精製したものをを用いた。

## 【0174】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625 mM dNTP混合物、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30 Uの大腸菌由来RNase H及び11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む3種類の反应用緩衝液（42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.5）、42.5 mM ビシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.3）及び42.5 mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝液（pH 7.8））40  $\mu$  lを添加し、最終容量を50  $\mu$  lにした。該反応液は、60℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3  $\mu$  lを3.0%アガロースゲル電気泳動で確認したところ、いずれの鋳型量においても目的の増幅断片が確認でき

た。特に、ピシンー水酸化カリウム緩衝液（pH 8. 5）を用いた反応系でより多くの増幅産物が得られた。

【 0 1 7 5 】

（２）さらに、ヘブスー水酸化カリウムバッファーによる反応性の向上について検討した。本実施例では、実施例 6 で調製した pUC19-150 プラスミド DNA を鋳型とし、配列表の配列番号 4 7 及び 4 8 記載の塩基配列を有する MCS-F および MCS-R プライマーにより PCR 増幅した DNA 断片を鋳型とした。また、キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、配列表の配列番号 4 9 及び 5 0 記載の塩基配列を有する MF2N3（24）プライマーおよび MR1N3（24）プライマーを使用した。該プライマーの組合せにより約 350 bp の増幅断片が得られる。

【 0 1 7 6 】

検討するバッファーは、ヘブスー水酸化カリウムバッファー系を選択し、対照としてリン酸カリウムバッファー系、トリシンバッファー系を使用した。以下に反応液組成を示す。

反応液 A；上記 PCR 増幅断片 10 ng、各 50 pmol ずつの MF2N3（24）プライマーおよび MR1N3（24）プライマー、0.01% プロピレンジアミン水溶液、および滅菌蒸留水で反応液量を 10  $\mu$  l とした。

反応液 B；以下の 3 種類を調製した。

リン酸カリウムバッファー系：最終濃度 28 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7. 5）、1% ジメチルスルホキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各 0.5 mM dNTP 混合物、60 U の大腸菌由来 RNase H および 5.5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼを含有し、滅菌蒸留水で 40  $\mu$  l にした。

トリシンバッファー系：最終濃度 34 mM トリシンバッファー（pH 8. 7）、10 mM 塩化カリウム、10 mM 硫酸アンモニウム、1% ジメチルスルホキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各 0.5 mM dNTP 混合物、30 U の大腸菌由来 RNase H および 5.5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼを含有し、滅菌蒸留水で 40  $\mu$  l にした。



ヘプスー水酸化カリウムバッファー系：最終濃度 20 mM ヘプスー水酸化カリウムバッファー (pH 7.8)、100 mM 酢酸カリウム、1% ジメチルスルホキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各 0.5 mM dNTP 混合物、30 U の大腸菌由来 RNase H および 5.5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼを含有し、滅菌蒸留水で 40  $\mu$ l にした。

## 【0177】

上記反応液 A を 98℃、2 分間熱変性処理した後、60℃ または 65℃ に冷却したのち氷上に静置した。氷上に置いておいた反応液 A に上記各反応液 B を加えて混合し、反応液を 50  $\mu$ l とした。該反応液を 60℃ または 65℃ で 1 時間インキュベートした。反応終了後 4℃ に冷却し、1/10 容量の 0.5 M EDTA を加えて反応を停止させた。この反応液 3  $\mu$ l を 3% ヌシープ 3:1 アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、反応温度に関わらず、3 種類のバッファー系で目的の増幅断片が確認できた。特に本実施例においては、ヘプスー水酸化カリウムバッファー系が最も増幅産物量が多く、反応性が高いことが確認できた。

## 【0178】

## 実施例 16

(1) 本発明の方法について、プライマーと鋳型のアニーリング条件について検討した。WO 97/32010 号公報パンフレット記載のフラボバクテリウム属細菌 (*Flavobacterium* sp.) の部分塩基配列に従って、配列表の配列番号 99 及び 100 記載の塩基配列を有するプライマーを使用した。なお、該プライマーは、3' 末端の 3 塩基がリボヌクレオチドである。また、本実施例においては、*Flavobacterium* sp. 由来のゲノム DNA を鋳型とし、配列表の配列番号 101 及び 102 記載のプライマーの組み合わせによる PCR 増幅産物 (573 bp) を Suprec 02 (宝酒造社製) で精製したものを鋳型 DNA として用いた。反応は以下のように行った。すなわち、各 120 pmol の上記プライマーに 2 種類のアニーリング溶液 (500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジン、あるいは 0.05% プロピレンジアミン) をそれぞれ 2  $\mu$ l 添加し、さらに 10 ng または 1 ng の上記 PCR 増幅断片を含む最終液量 10  $\mu$ l の混合液を 98℃ で 2 分間、熱変性させた。変性後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳

型にアニールさせた。

【0179】

上記アニーリング処理後、該混合液に各 0.625 mM dNTP 混合物、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125 % ウシ血清アルブミン、1.25 % ジメチルスルホキシド、30 U の大腸菌由来 RNase H 及び 11 U の BcaB EST DNA ポリメラーゼを含む 3 種類の緩衝液 (42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH 8.5) 緩衝液、42.5 mM ビシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH 8.3)、及び 42.5 mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝液 (pH 7.8)) のそれぞれを 40  $\mu$ l 添加し、最終容量を 50  $\mu$ l にした。該反応液は、52℃ で 1 時間保持した。反応終了後、反応液 3  $\mu$ l を 3.0 % アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 3 に示す。図 3 は、アニーリング溶液と緩衝液のそれぞれの組み合わせについての反応後の電気泳動写真であり、レーン 1 は分子量マーカー (100 bp ラダー、宝酒造社製)、レーン 2 はプロピレンジアミン/トリシン (鋳型 10 ng)、レーン 3 はプロピレンジアミン/ヘプス (鋳型 10 ng)、レーン 4 はプロピレンジアミン/ヘプス (鋳型 1 ng)、レーン 5 はプロピレンジアミン/ビシン (鋳型 10 ng)、レーン 6 は、プロピレンジアミン/ビシン (鋳型 1 ng)、レーン 7 は 500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジン/ビシン (鋳型 10 ng)、レーン 8 は 500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジン/ビシン (鋳型 1 ng)、レーン 9 は分子量マーカー (100 bp ラダー)、レーン 10 はプロピレンジアミン/トリシン (鋳型 1 ng)、レーン 11 は 500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジン/トリシン (鋳型 1 ng)、レーン 12 はプロピレンジアミン/ヘプス (鋳型 1 ng)、レーン 13 は 500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジン/ヘプス (鋳型 1 ng)、レーン 14 はプロピレンジアミン/ビシン (鋳型 1 ng)、レーン 15 は 500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジン/ビシン (鋳型 1 ng) である。

【0180】

図 3 に示したように、鋳型 DNA 量に関わらず、上記 3 種類のいずれの緩衝液においてもプライマーと鋳型 DNA のアニーリングに 500 mM 塩化カリウム

+ 8  $\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液を使用したものがより多くの目的と増幅産物が得られた。特に本実施例においては、500 mM 塩化カリウム + 8  $\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液とピシンー水酸化カリウム緩衝液との組み合わせが良好であった。

## 【0181】

(2)  $\lambda$  DNAのPCR増幅断片を鋳型とした場合のアニーリング溶液の効果について検討した。本実施例において、実施例15(1)記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。鋳型DNAは、実施例15(1)で調製したPCR増幅断片及び $\lambda$  DNAを用いた。反応は、以下のように行った。各120 pmolの上記プライマーに3種類のアニーリング溶液溶液(500 mM 塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジン、0.05%プロピレンジアミンまたは滅菌水)をそれぞれ2  $\mu$ l加え、さらに10 ngまたは1 ngのPCR増幅断片を含む全液量10  $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液を98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニールさせた。

## 【0182】

アニーリング処理後に各0.625 mM dNTP混合物、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30 Uの大腸菌由来RNase H及び11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む3種類の緩衝液(42.5 mM トリシンー水酸化カリウム緩衝液(pH 8.5)、42.5 mM ピシンー水酸化カリウム緩衝液(pH 8.3)、及び42.5 mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝液(pH 7.8))をそれぞれ40  $\mu$ l添加し、最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液を60℃で1時間保持した。反応終了後、該反応液3  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図4に示す。図4は、鋳型量と反応緩衝液とアニーリング溶液の組み合わせについて検討した結果の電気泳動写真であり、レーン1はマーカ(100 bpラダー)、レーン2は鋳型10 ngでトリシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジンの組み合わせ、レーン3は鋳型1 ngでトリシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジンの組み合わせ、レーン4は鋳型10 ngでピシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジンの組み

合わせ、レーン 5 は鋳型 1 n g でピシン / 5 0 0 m M 塩化カリウム及び 8  $\mu$  M スペルミジンの組み合わせ、レーン 6 は鋳型 1 0 n g でヘルス / 5 0 0 m M 塩化カリウム及び 8  $\mu$  M スペルミジンの組み合わせ、レーン 7 は鋳型 1 n g でヘルス / 5 0 0 m M 塩化カリウム及び 8  $\mu$  M スペルミジンの組み合わせ、レーン 8 は分子量マーカー ( 1 0 0 b p ラダー ) 、レーン 9 は、鋳型 1 0 n g でトリシン / プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン 1 0 は鋳型 1 n g でトリシン / プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン 1 1 は鋳型 1 0 n g でピシン / プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン 1 2 は鋳型 1 n g でピシン / プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン 1 3 は鋳型 1 0 n g でヘルス / プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン 1 4 は鋳型 1 n g でヘルス / プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン 1 5 は分子量マーカー ( 1 0 0 b p ラダー ) 、レーン 1 6 は鋳型 1 0 n g でトリシン / 水の組み合わせ、レーン 1 7 は鋳型 1 n g でトリシン / 水の組み合わせ、レーン 1 8 は鋳型 1 0 n g でピシン / 水の組み合わせ、レーン 1 9 は鋳型 1 n g でピシン / 水の組み合わせ、レーン 2 0 は鋳型 1 0 n g でヘルス / 水の組み合わせ、レーン 2 1 は鋳型 1 n g でヘルス / 水の組み合わせである。

## 【 0 1 8 3 】

図 4 に示したように、鋳型 DNA 量に関わらず、上記 3 種類の緩衝液と上記 3 種類のアニーリング溶液の組み合わせのいずれにおいても目的の増幅断片が得られることが確認できた。特に、ピシン緩衝液と 5 0 0 m M 塩化カリウム及び 8  $\mu$  M スペルミジンを含むアニーリング溶液との組み合わせにおいて、より多くの増幅断片が得られることが確認できた。

## 【 0 1 8 4 】

## 実施例 1 7

逆転写酵素 ( R T a s e ) 阻害剤存在下での本発明の方法について検討した。上記 R T a s e 阻害剤としてホスホノギ酸 ( P F A : P h o s p h o n o f o r m i c a c i d ) を用いた。本実施例においてプライマーは、配列表の配列番号 1 0 3 及び 1 0 4 記載のものを使用した。なお、該プライマーは、3' 末端の 3 残基がリボヌクレオチドである。また、鋳型 DNA としては、腸管出血性大腸菌 O 1 5 7 のゲノム DNA を鋳型とし、配列表の配列番号 1 0 5 及び 1 0 6 記載

のプライマーによるPCR増幅産物(576bp)をSuprec02で精製したものを用了。反応は以下のように行った。すなわち、各120pmolの上記プライマーと2 $\mu$ lの500mM 塩化カリウム及び8 $\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液に1ngのPCR増幅断片を添加した全液量10 $\mu$ lの混合液を、98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニールさせた。

## 【0185】

上記アニーリング処理後、該処理液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30Uの大腸菌由来RNaseH、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、さらに500 $\mu$ g/mlあるいは50 $\mu$ g/mlの濃度になるようにPFAを添加し、最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、55℃で1時間保持した。対照として、PFAを添加しない系も同様に調製した。反応終了後の反応液9 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図5に示す。図5は、逆転写酵素活性阻害剤の効果を示す電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー(100bpラダー)、レーン2はPFA無添加、レーン3は500 $\mu$ g/mlのPFA添加、レーン4は50 $\mu$ g/mlのPFA添加結果である。

## 【0186】

図5に示したように、PFAを添加することにより非特異的な増幅が抑制され、さらに目的の増幅断片が確認できた。特に500 $\mu$ g/mlになるように添加した系では、添加していない系で見られる非特異的な増幅産物が見られず、目的の増幅断片が明瞭に増幅されていることが確認できた。

## 【0187】

## 実施例18

本発明の方法について増幅断片長と検出感度の関係について検討した。

(1) 配列表の配列番号107~109記載の大腸菌O-157ペロ毒素増幅用プライマーを合成した。さらに、実施例17で使用したキメラオリゴヌクレオチ

ドプライマーも使用した。なお、該プライマーは、3'末端の3残基がリボヌクレオチドである。上記プライマーの組み合わせと増幅断片長は、配列表の配列番号107及び104の機見合わせで247bp、108及び109の組み合わせで168bp、108及び104の組み合わせで206bp、103及び109の組み合わせで135bp、103及び104の組み合わせで173bpである。本実施例において鋳型DNAは、実施例17で調製した576bpのPCR増幅断片精製物を用いた。反応は、以下のように行った。すなわち、上記各60pmolのプライマーと2μlの0.05%プロピレンジアミン水溶液、10fg~10ngの上記PCR増幅断片を含む全液量10μlの混合液をサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）で98℃で2分間熱変性後、55℃に冷却し、鋳型にプライマーをアニーリングさせた。

#### 【0188】

上記アニーリング処理した混合液に0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH8.5）、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30Uの大腸菌由来RNaseH、5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、及び滅菌水を含む全液量40μlの反応液を添加し、最終容量を50μlにした。該反応液は、55℃で1時間保持した。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。対照として、配列表の配列番号110及び111記載のプライマーを用いて、上記PCR増幅断片1pg~10fgの検出を行った。上記プライマーの組み合わせにより、135bpの増幅断片が得られる。すなわち、各60pmolのプライマー、10×Ex Taqバッファー（宝酒造社製）5μl、1.25Uのタカラ Ex Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）、0.2mM dNTP混合物を含む全量50μlのPCR溶液を調製した。PCR条件は、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクル（所要時間は、2分38秒）とした25または30サイクルで行った。反応終了後、ICAN法の場合は1μl、PCR法の場合は、5μlの反応液を3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図6及び表4に示す。

【 0 1 8 9 】

【表 4】

表 4

増幅サイズ(bp)	検出限界
I C A N 法 ; (全所要時間、70分)	
247	100 p g
168	100 f g
206	100 p g
135	10 f g
173	100 f g
P C R 法 (25サイクル: 全所要時間、約66分)	
135	100 f g
P C R 法 (30サイクル: 全所要時間、約80分)	
135	10 f g

【 0 1 9 0 】

図 6 は、I C A N 法 (反応液の 1 / 5 0 量を泳動) 及び P C R 法 (反応液の 1 / 1 0 量を泳動) での増幅鎖長 1 3 5 b p の場合の検出限界を示す電気泳動写真であり、レーン 1 は分子量マーカー (1 0 0 b p ラダー)、レーン 2 は I C A N 法で鋳型 1 p g の場合、レーン 3 は I C A N 法で鋳型 1 0 0 f g の場合、レーン 4 は I C A N 法で鋳型 1 0 f g の場合、レーン 5 は 2 5 サイクルの P C R 法で鋳型 1 p g の場合、レーン 6 は 2 5 サイクルの P C R 法で鋳型 1 0 0 f g の場合、レーン 7 は 2 5 サイクルの P C R 法で鋳型 1 0 f g の場合、レーン 8 は 3 0 サイクルの P C R 法で鋳型 1 p g の場合、レーン 9 は 3 0 サイクルの P C R 法で鋳型 1 0 0 f g の場合、レーン 1 0 は 3 0 サイクルの P C R 法で鋳型 1 0 f g の場合である。

【 0 1 9 1 】

表 4 に示したように P C R 法とほぼ同等の検出感度を得られることを確認した。さらに、同じ検出感度の場合、P C R 法の反応所要時間約 8 0 分に比べ、本発

明の方法の反応所要時間は70分となり、所要時間の短縮ができることを確認した。

# 【0192】

(2) 配列表の配列番号95～96及び112記載の塩基配列を有するλDNA増幅用のプライマーを合成した。なお、該プライマーは、3'末端の3残基がリボヌクレオチドである。該プライマーの組み合わせと増幅断片長は、配列表の配列番号95及び96の場合は151bp、112及び96の場合は125bpである。また、本実施例において鋳型DNAは、実施例15(1)で調製したものを使用した。反応は以下のように行った。すなわち、各120pmolの上記プライマーに2μlのアニーリング溶液(500mM 塩化カリウム及び8μM スペルミジン)と、1fg～1ngの鋳型を加え、滅菌水で全液量を10μlにした。該液を98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

# 【0193】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30ユニットのRNaseH、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し滅菌水で最終容量を50μlにした。該反応液は、60℃で1時間保持した。反応終了後、該反応液3μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表5に示した。

# 【0194】

【表5】

表5	増幅サイズ (bp)	検出限界
	125	10fg
	151	100fg

# 【0195】



表5に示したように $\lambda$  DNAを鋳型にした場合においても、最適な領域を検討することにより、検出感度を10 fgまで下げることができることを確認した。

# 【0196】

(3) 配列表の配列番号113及び114記載の塩基配列を有する菊ウィロイド遺伝子増幅用プライマーを合成し、ウィロイド感染菊由来RNAを鋳型として特願平9-140383公報記載の方法で調製した増幅断片(全長340 bp)をプラスミドT7ブルーTベクター(宝酒造製)に挿入して調製した。これを大腸菌JM109コンピテントセル(宝酒造製)に形質転換を行い、LB培地5 mlにて37℃16時間培養した。菌体を回収し、QIAGEN Plasmid Mini Kit(キアゲン社製)を用いてマニュアルに従い、プラスミドの精製をおこなった。ベックマンDU-600(ベックマン製)にて濃度測定を行い、滅菌水にて1  $\mu$  lあたりプラスミド濃度0、1 fg、10 fg、100 fg、1 pg、10 pg、100 pg、1 ngに調製した。ICAN反応系50  $\mu$  lにおいて上記調製プラスミド溶液1  $\mu$  lを鋳型として用いた。本実施例においてプライマーは、配列表の配列番号115及び116記載の塩基配列を有するCSV D-F2プライマーとCSV D-R6プライマーを使用した。該プライマーは、3'末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応は、以下のように行った。すなわち、上記プライマー各50 pmol、0.01%プロピレンジアミンを含むアニーリング溶液、各調製プラスミド溶液1  $\mu$  lを添加し、滅菌水で全液量10  $\mu$  lの混合液を調製した。該混合液をサーマルサイクラーパーソナル(宝酒造製)にて98℃、2分間熱処理後、60℃まで冷却し、1分間保持後、氷上に保存した。

# 【0197】

アニーリング処理後、上記混合液に最終濃度20 mM ヘプスー水酸化カリウムバッファー(pH7.8)、100 mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.01%ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各500  $\mu$  M dNTP混合物、30 Uの大腸菌由来RNase H、5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50  $\mu$  lにした。該反応液をあらかじめ、60℃に設定したサーマルサイクラーパーソナルにセット

し60分間反応させた。反応終了後、各反応液3 $\mu$ lを3%ヌシーブ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果、目的とする増幅産物(約90bp、約70bp、約50bp)について、10fgの鋳型濃度の場合まで確認できた。

# 【0198】

## 実施例19

本発明の方法で使用するプライマーについて検討した。

(1) プライマーの $T_m$ 値と反応温度について検討した。配列表の配列番号99及び117~119記載の塩基配列を有する、フラボバクテリウム属(*Flavobacterium* sp.)増幅用プライマーを合成した。該プライマーは、3'末端の3残基がリボヌクレオチドである。さらに該プライマーは、160bp以下でGC含量が約20%の領域を増幅するように構築した。該プライマーの組み合わせと増幅断片長は、配列表の配列番号99及び118の場合は126bp、99及び119の場合は158bp、117及び118の場合は91bp、117及び119bpの場合は123bpである。なお、本実施例において鋳型となるDNAは、*Flavobacterium* sp. SA-0082株(通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所[日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)]に平成7年(1995年)3月29日よりFERM P-14872として寄託され、前記通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5402[国際寄託への移管請求日:平成8年(1996年)2月15日]として寄託)由来のゲノムDNAを常法により調製し、該ゲノムDNAを鋳型とし、配列表の配列番号101及び102記載の塩基配列を有するプライマーによるPCRで得られた増幅産物(573bp)をSuprec02で精製したものを用いた。反応は以下のように行った。すなわち、各120pmolの上記プライマー、2 $\mu$ lの3種類のアニーリング溶液(500mM 塩化カリウム及び8 $\mu$ M スペルミン、0.05%プロピレンジアミン、または水)と、1fg~10ngの鋳型を含む全液量10 $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液を98℃で2分間、熱変性させた後、水中で冷却することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

# 【0199】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625mM dNTP混合物、5.

0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30 UのRNase H及び11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む3種類の緩衝液（17 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.5）、17 mM ピシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.3）、及び20 mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝液（pH 7.8））を40  $\mu$ lを添加し、最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液を52℃、55℃または60℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、反応温度が52℃の場合に目的の増幅断片が確認できた。特に、500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジンを含むアニーリング溶液とトリシン、あるいはピシン緩衝液の組み合わせにおいてより多くの目的とする増幅断片が得られた。反応温度が52℃におけるプライマー対、増幅断片長及び検出感度について図7及び表6に示す。

## 【0200】

【表6】

増幅サイズ (bp)	検出限界
126	100 fg
158	1 pg
91	1 fg
123	100 fg

## 【0201】

図7は、ATリッチな領域を増幅する場合の増幅断片長と鋳型DNA量の関係を示した電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーン2は増幅断片長91 bpで鋳型1 pgの場合、レーン3は増幅断片長91 bpで鋳型100 fgの場合、レーン4は増幅断片長91 bpで鋳型10 fgの場合、レーン5は増幅断片長91 bpで鋳型1 fgの場合、レーン6は増幅断片長123 bpで鋳型1 pgの場合、レーン7は増幅断片長123 bpで鋳型100 fgの場合、レーン8は増幅断片長123 bpで鋳型10 fgの場合、レーン

ン9は増幅断片長126bpで鋳型1pgの場合、レーン10は増幅断片長126bpで鋳型100fgの場合、レーン11は増幅断片長126bpで鋳型10fgの場合、レーン12は増幅断片長158bpで鋳型1pgの場合、レーン13は増幅断片長158bpで鋳型100fgの場合、レーン14は増幅断片長158bpで鋳型10fgの場合である。

## 【0202】

図7及び表6に示したように、ATリッチな鋳型に対し、ATリッチなプライマーセットで本発明の方法を行う場合は、プライマーの $T_m$ 値にあわせて、反応温度を下げると良いことが明らかになった。

## 【0203】

(2) 本発明の方法においてプライマーの高次構造が反応性に影響を与えることが考えられた。従って、プライマーの高次構造を回避し、プライマーが本来の鋳型にアニーリングしやすくするためのプライマーの修飾を検討した。プライマーは、配列表の配列番号103～104及び120～125記載のそれぞれのプライマーを使用した。すなわち、配列表の配列番号103記載の塩基配列を有するプライマー、配列番号120～122記載の塩基配列を有するプライマーで、さらに3'末端より4塩基目、5塩基目、6塩基目の塩基がそれぞれイノシンデオキシヌクレオチドである120I4、121I5及び122I6プライマー、配列表の配列番号104記載の塩基配列を有するプライマー、配列番号123～125記載の塩基配列を有するプライマーで、さらに3'末端より4塩基目、5塩基目、6塩基目の塩基がそれぞれイノシンデオキシヌクレオチドである123I4、124I5及び125I6プライマーを使用した。本実施例において鋳型DNAは、実施例17で調製したものを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各50pmolのプライマー、2 $\mu$ lの0.05%プロピレンジアミン水溶液、1ng～10ngの鋳型DNA及び滅菌蒸留水を含む全液量10 $\mu$ lの混合液をサーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9600、アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、98℃で2分間、続いて55℃まで冷却し、1分間保持した。

## 【0204】

アニーリング処理後、該混合液に0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30Uの大腸菌由来RNase Hあるいは5Uのサーマスサーモフィラス(Tth)由来RNase H(東洋紡社製)及び5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、55℃で1時間保持した。反応終了後、反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図8に示す。

## 【0205】

図8は、大腸菌由来RNase H及びサーマスサーモフィラス由来RNase Hを使用した場合のイノシンデオキシヌクレオチド含有キメラオリゴヌクレオチドプライマーの効果について示した電気泳動写真でありレーン2～レーン9までは、大腸菌由来RNase H、レーン10～17は、*Thermus thermophilus*由来RNase Hを使用した場合である。レーン1は分子量マーカー(100bpラダー)、レーン2は配列番号103及び104記載のプライマー対で鋳型1ngの場合、レーン3は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン4は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン5は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン6は配列表の配列番号103及び104記載のプライマー対で鋳型10ngの場合、レーン7は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型10ngの場合、レーン8は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型10ngの場合、レーン9は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン10は、配列表の配列番号103及び104記載のプライマー対で鋳型1ngの場合、レーン11は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン12は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン13は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン14は配列表の配列番号103及び104記載のプライマー対で鋳型10ngの場合、レーン15は、120I4及び123I4プライマー対で鋳

型10 ngの場合、レーン16は、121 I 5及び124 I 5プライマー対で鋳型10 ngの場合、レーン17は、122 I 6及び125 I 6プライマー対で鋳型10 ngの場合である。

## 【0206】

図8に示したように、鋳型量に関わらず、また、大腸菌あるいはサーマスサーモフィラス由来RNase Hのいずれを用いた場合においてもプライマーの3'末端より4塩基目あるいは5塩基目にイノシンを導入したプライマーにおいて目的の増幅産物の増加が確認できた。このことより、イノシンを適当な位置に入れることにより、ICANの反応性が向上することが明らかになった。

## 【0207】

(3) 上記(2)と同様の目的でプライマーの検討を行った。プライマーは、配列表の配列番号142及び143記載の塩基配列の塩基配列を有するプライマーで、さらに3'末端の3塩基が( $\alpha$ -S、あるいはalpha-thio) リボヌクレオチドであるもの、すなわち、RNA部分が5'-ホスホチオエート結合を持つオリゴヌクレオチドプライマー1Sおよび4Sを合成した。また、配列表の配列番号126及び127記載の塩基配列を有するプライマーで、さらに3'末端の3塩基と該プライマーのデオキシリボヌクレオチド部分の配列の一部がリボヌクレオチドである、すなわち、該プライマーの3'末端より11塩基目から13塩基目までがリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドプライマー1N3N3および4N3N3を合成した。鋳型となるDNAは、実施例17で調製したものを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各50 pmolのプライマー、2  $\mu$ lの0.05%プロピレンジアミン水溶液、10 ngの鋳型DNA及び滅菌水を含む全液量10  $\mu$ lの混合液をサーマルサイクラーを用いて、98℃で2分間加熱処理を行ったのち、水中に移し冷却した。

## 【0208】

アニーリング処理後、上記混合液に0.625 mM dNTP混合物、42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH 8.5)、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30 Uの大腸菌由来RNase H あるいは5 UのTth RNase H

及び5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液を、サーマルサイクラーで55℃で1時間保持した。

反応終了後、反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、いずれのRNaseHを用いた場合においても、1Sと4Sのプライマーの組み合わせおよび1N3N3と4N3N3のプライマーの組み合わせにおいて目的の位置に明らかな増幅産物が確認できた。このことから、プライマーの3'末端部分の5'-ホスホチオエート化は、本発明の方法において有効であることを確認した。さらに、プライマーの3'末端に加え、内部の適当な位置をリボヌクレオチドに置き換えた場合でも本発明の方法の反応性の向上に有効であることを確認した。

#### 【0209】

#### 実施例20

特定の金属イオン存在下でRNaseH活性を有するDNAポリメラーゼを用いた本発明の方法について検討した。実施例15(1)で使用したキメラオリゴヌクレオチドプライマーを各120 $\mu$ mol、2 $\mu$ lの500mM塩化カリウム及び8 $\mu$ Mスペルミジンを含むアニーリング溶液、実施例15(1)で用いた1ngの鋳型DNA及び滅菌水含む全液量10 $\mu$ lの混合液を98℃で2分間、熱変性させた後、水中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。アニーリング処理後、該混合液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.0%ジメチルスルホキシド、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、さらに塩化マンガン(ナカライテスク社製)を0.5mM、2.5mM、5.0mM、10mMの濃度になるように添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、60℃で1時間保持した。さらに、対照として塩化マンガンを添加しないもの、及び30UのRNaseH(宝酒造社製)を添加し、塩化マンガンを添加しないものも調製した。反応終了後、反応液3 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図9に示す。

## 【0210】

図9は、Bca DNAポリメラーゼのRNaseH活性を利用した場合のICAN法の結果を示す電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100bpラダー）、レーン2は塩化マンガン無添加/RNaseH添加の場合、レーン3は塩化マンガン無添加/RNaseH無添加の場合、レーン4は0.5mM塩化マンガン添加/RNaseH無添加の場合、レーン5は2.5mM塩化マンガン添加/RNaseH無添加の場合、レーン6は5.0mM塩化マンガン添加/RNaseH無添加の場合、レーン7は10.0mM塩化マンガン添加/RNaseH無添加の場合を示す。

## 【0211】

図9に示したようにRNaseH非存在下において、塩化マンガンを経験的に2.5mMになるように添加した反応系で、目的の増幅産物が確認された。

## 【0212】

## 実施例21

本発明の方法について、実際の生体試料で検討した。

(1) ATCC登録番号43895の腸管出血性大腸菌O-157を培養後、熱水抽出した物を鋳型として検出を行った。腸管出血性大腸菌O-157をノボピオシン加mEC培地にて42℃、18時間培養後、95℃、10分間熱処理をおこなった。これを滅菌水にて0、1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ セルに相当するO-157熱水抽出物を調製した。このO-157熱水抽出物を用い、実施例18(1)と同様の条件で、ベロ毒素2型(VT2)遺伝子の増幅を行った。また、対照として、同じ鋳型を用いて実施例18(1)記載の条件でPCR増幅も行った。反応終了後、ICAN法では反応液1 $\mu$ l、PCR法では、反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表7及び図10に示す。

## 【0213】



【表 7】

表7

増幅サイズ (b p)	検出限界 (セル)
I CAN法: 所要時間、70分	
135	$10^2$
173	$10^3$
PCR法 (25サイクル: 所要時間、約66分)	
135	$10^3$
PCR法: (30サイクル、所要時間、約80分)	
135	$10^2$

## 【0214】

図10は、I CAN法及びPCR法を用いたO157の検出を示す電気泳動写真であり、増幅鎖長は135bpである。レーン1は分子量マーカ（100bpラダー）、レーン2はI CAN法で細胞 $10^4$ 個、レーン3はI CAN法で細胞 $10^3$ 個、レーン4はI CAN法で細胞 $10^2$ 個、レーン5は25サイクルのPCRで細胞 $10^4$ 個、レーン6は25サイクルのPCR法で細胞 $10^3$ 個、レーン7は25サイクルのPCRで細胞 $10^2$ 個、レーン8は30サイクルのPCRで細胞 $10^4$ 個、レーン9は30サイクルのPCR法で細胞 $10^3$ 個、レーン10は30サイクルのPCRで細胞 $10^2$ 個の場合である。

## 【0215】

表7及び図10に示したように、本発明の検出方法は、PCR法と同等の検出感度を有し、さらにPCR法よりも短時間で検出できることを確認した。

## 【0216】

(2) 実施例15及び17で用いた配列表の配列番号96及び112のプライマーを用いて、 $\lambda$  DNAを検出した。該プライマーは、3'末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各120pmolのプライマー、2 $\mu$ lの500mM塩化カリウム及び8 $\mu$ Mスベルミジンを含むアニーリング溶液、10fg~1ngの $\lambda$  DNA（宝酒造社製）及び滅

菌水を含む全液量  $10\mu\text{l}$  の混合液を調製し、 $98^{\circ}\text{C}$  で 2 分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

## 【0217】

アニーリング処理後、該混合液に各  $0.625\text{mM}$  dNTP 混合物、 $42.5\text{mM}$  トリシン-水酸化カリウム緩衝液 ( $\text{pH}8.5$ 、 $5.0\text{mM}$  酢酸マグネシウム、 $0.0125\%$  ウシ血清アルブミン、 $1.25\%$  ジメチルスルホキシド、 $30\text{U}$  の大腸菌由来 RNase H 及び  $11\text{U}$  の BcaBEST DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を  $50\mu\text{l}$  にした。該反応液は、 $60^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保持した。反応終了後、反応液  $3\mu\text{l}$  を  $3.0\%$  アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表 8 に示す。

## 【0218】

【表 8】

表 8

増幅サイズ (bp)	検出限界
125	1pg

## 【0219】

表 8 に示したように、 $\lambda$  DNA の検出において本発明の方法は有効であることを確認した。

## 【0220】

(3) フラボバクテリウム細菌 (Flavobacterium sp. SA-0082 株) のゲノム DNA を鋳型とし、実施例 19 (1) で用いた配列表の配列番号 117 及び 118 記載のプライマーを用いて検出を行った。鋳型として、WO97/32010 号公報パンフレット記載の方法で培養したフラボバクテリウム細菌からゲノム DNA を常法により調製した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各  $120\text{pmol}$  のプライマー、 $2\mu\text{l}$  の  $500\text{mM}$  塩化カリウム及び  $8\mu\text{M}$  スペルミジンを含むアニーリング溶液、 $10\text{fg}\sim 1\text{ng}$  のゲノム DNA 及び滅菌水で全液量  $10\mu\text{l}$  の混合液を調製し、 $98^{\circ}\text{C}$  で 2 分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

## 【0221】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30Uの大腸菌由来RNase H及び11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、52℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表9及び図11に示す。

## 【0222】

【表9】

表9

増幅サイズ (bp)	検出限界
91	100fg

## 【0223】

図11は、フラボバクテリウム属細菌の検出を示す電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー(100bpラダー)、レーン2は鋳型1ng、レーン3は鋳型10pg、レーン4は鋳型1pg、レーン5は鋳型100fg、レーン6は鋳型10fgの場合である。

## 【0224】

表9及び図11に示したように細菌の検出において、本発明の方法は有効であることを確認した。

## 【0225】

## 実施例22

本発明の増幅方法とハイブリダイゼーション法との組み合わせによる標的核酸の検出方法を検討した。ターゲットとして、腸管出血性大腸菌O-157を選択した。鋳型DNAは、実施例21(1)記載の方法で調製した。増幅断片長は、GC含量約40%で約100bpの領域を選び、プライマーとして配列表の配列番号107及び128記載の塩基配列で示されるVT2-IF20及びVT2-

IR20-2プライマーを使用した。該プライマーは、3'末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応は、以下のように行った。すなわち、各50 pmolのVT2-IF20及びVT2-IR20-2プライマー、0.01%プロピレンジアミンを含むアニーリング溶液、0、1、10セル相当の各細胞数熱抽出液及び滅菌水で全液量10  $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液をサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造製）にて98℃ 2分間、熱変性後、55℃まで冷却し、1分間保持後、さらに氷上に置き、アニーリング処理を行った。

## 【0226】

アニーリング処理後、上記混合液に最終濃度20 mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝液（pH7.8）、100 mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.01%ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各500  $\mu$ M dNTP混合物、30 Uの大腸菌由来RNase H及び5.5 UのBcaBEST DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液は、あらかじめ55℃に設定したサーマルサイクラーパーソナルにセットし60分間保持した。対照として0-157 Typing Set（宝酒造製）を用い、マニュアル通りにサーマルサイクラーパーソナルにてPCRを行った。PCR条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとする35サイクルで行った。該反応での所要時間は、1サイクルが約4分で、全所要時間は、約145分になる。この際、予想される増幅産物は、404 bpである。反応終了後、各反応液3  $\mu$ lを3%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を表10に示す。

## 【0227】

【表 10】

	O-157大腸菌細胞数		
	0	1	10
ICAN法	—	+	+++
PCR法	—	+	++

—: 増幅しない      +~+++ : 増幅の程度を3段階で示す。

## 【0228】

表10に示したように、本発明の検出方法もPCR法も予想される増幅産物を1細胞相当量の熱抽出液を用いた反応系まで得ることができた。さらに、増幅産物については、配列表の配列番号129記載の塩基配列で示される5'末端にビオチン標識されたVT2 オリゴヌクレオチドプローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズは以下の条件で行った。すなわち、98℃、5分間変性後、氷上にて急冷させた反応液1μlをHybond-N（アマシャム製）にスポットし、UV照射後、ハイブリバックに入れ、0.25M リン酸水素二ナトリウム（pH7.2）、1mM エチレンジアミン四酢酸、7%ラウリル硫酸ナトリウムのハイブリ溶液10mlを添加し、42℃でプレハイブリダイゼーション30分間行なった。次に上記VT2 プローブ 100ng/μlの10μlを熱変性後、プレハイブリダイゼーション反応系に添加した。42℃、60分間ハイブリダイゼーション後、66.6mM 塩化ナトリウム、66.6mM クエン酸三ナトリウム水和物、0.1%ラウリル硫酸ナトリウムの溶液で室温にて5分間2回洗浄し、洗浄バッファー（0.3M塩化ナトリウム、17.3mM リン酸二水素ナトリウム二水和物、17.3mMリン酸二水素ナトリウム無水物、17.3mM リン酸二水素ナトリウム七水和物、17.3mM リン酸二水素ナトリウム十二水和物、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム）6mlに5mg/mlのHRP-streptavidin conjugate（PIERCE製）を2μl添加し、42℃、12分間インキュベート後、洗浄バ

ッファーで、室温で2回洗浄した。その後、0.1M クエン酸バッファー (pH 5.0) 10 ml 室温で洗浄し、0.1M クエン酸バッファー 5 ml、3% 過酸化水素 5  $\mu$ l、2 mg/ml テトラメチルベンジジエタノール溶液 (TM B、ナカライ社製) 250  $\mu$ l の混合溶液で暗室にて約10分間反応させた。発色後、脱イオン水にて反応停止させた。その結果は、上記電気泳動結果と同一であった。

すなわち、本発明の方法の検出感度もPCRの検出感度も同等であることから、増幅反応の全所要時間を比較するとPCRに対し本発明のICAN法は、1/2以下の時間で行えることができ、病原菌等の検出方法として有効であることを確認した。

#### 【0229】

##### 実施例 23

(1) 培養細胞由来RNAを鋳型として、逆転写反応と本発明の方法の組み合わせを検討した。反応は、以下のように行った。すなわち、10%ウシ胎児血清 (ギブコ社製) 含有、ダルベッコ改良イーグル培地 (バイオウィタカー社製、12-604F) にRAW264.7細胞 (ATCC TIB 71) を $1.5 \times 10^5$ /mlになるように懸濁し、6穴マイクロタイタープレートのウェルに5 ml ずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。各ウェルに50 ml の100  $\mu$ g/mlのリボポリサッカライド (LPS、シグマ社製、L-2012) 水溶液および50  $\mu$ lの1000 U/ $\mu$ l インターフェロン- $\gamma$ 水溶液 (IFN- $\gamma$ 、ジェンザイムテクネ社製、3485) を添加して4時間培養後、R Neasy Mini Kit (キアゲン社製、74104) を用いてキットの説明書に従いRNAを調製した。なお、陰性対照としてLPSおよびIFN- $\gamma$ を添加しない区分を設定した。

#### 【0230】

上記により調製したRNA 3  $\mu$ gと10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM dNTP混合物、150 pmolのランダム6mers、60 Uのリボヌクレアーゼ インヒビター (宝酒造社製、2310A)、15 UのReverse Transcripta

se XL (AMV) (宝酒造社製、2620A) を含む全液量  $60\mu\text{l}$  をサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9600、アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、 $30^{\circ}\text{C}$  で10分間、続いて  $42^{\circ}\text{C}$  で1時間保温した後、酵素を失活させるために  $99^{\circ}\text{C}$  で5分間加熱して cDNA を調製した。

#### 【0231】

マウス誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の mRNA の塩基配列 (GeneBank accession No. NM-010927) に従って、配列表の配列番号 130 及び 131 記載の塩基配列を有するプライマーを合成した。該プライマーは、3' 末端の3残基がリボヌクレオチドである。また、対照として PCR のために配列表の配列番号 132 及び 133 記載のプライマーも合成した。

#### 【0232】

各  $50\text{ pmol}$  の上記プライマーと  $2\mu\text{l}$  の  $0.05\%$  プロピレンジアミン水溶液、鋳型として上記 cDNA  $1\mu\text{l}$  (RNA として  $50\text{ ng}$  相当) 及び滅菌水で全液量  $10\mu\text{l}$  の混合液を調製した。該混合液は、サーマルサイクラーで  $98^{\circ}\text{C}$  で2分間、熱変性後、 $55^{\circ}\text{C}$  に冷却し、1分間保持して鋳型にプライマーをアニーリングさせた。

#### 【0233】

アニーリング処理後、上記混合液に  $0.625\text{ mM}$  dNTP 混合物、 $42.5\text{ mM}$  トリシン-水酸化カリウム緩衝液 ( $\text{pH} 8.5$ )、 $5.0\text{ mM}$  酢酸マグネシウム、 $0.0125\%$  ウシ血清アルブミン、 $1.25\%$  ジメチルスルホキシド、 $15\text{ U}$  の大腸菌由来 RNase H、 $11\text{ U}$  の BcaBEST DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を  $50\mu\text{l}$  にした。該反応液は、サーマルサイクラーで  $55^{\circ}\text{C}$ 、1時間保持した。反応後のサンプルは分析するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結して保存した。対照の PCR は以下のように行った。すなわち、各  $50\text{ pmol}$  のプライマーと cDNA  $1\mu\text{l}$  (RNA として  $50\text{ ng}$  相当) を含む  $10\times\text{Ex Taq}$  バッファー (宝酒造社製)  $5\mu\text{l}$ 、 $1.25\text{ U}$  タカラ Ex Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製)、 $0.2\text{ mM}$  dNTP 混合物を含む全液量  $50\mu\text{l}$  の反応液をサーマルサイクラーを用い、 $94^{\circ}\text{C}$  2分間

を1サイクル、次に94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとする30サイクル、さらに72℃ 5分間の1サイクルのプログラムで反応を行った。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。反応終了後、各反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図12に示す。

## 【0234】

図12は、RT-ICAN法及びRT-PCR法の比較を示した電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100bpラダー）、レーン2は陰性対照区分、レーン3はLPS、IFN- $\gamma$ 処理区分である。

## 【0235】

図12に示したように、本発明の方法およびPCRのいずれの反応においても、LPSおよびIFN- $\gamma$ で処理した細胞より調製したcDNAを鋳型にした場合のみ増幅産物が確認された。従って、PCR法より反応所要時間が短い本発明の方法が、逆転写反応後のDNA増幅方法として有効であることを確認した。

## 【0236】

## 実施例24

大腸菌由来RNase Hの至適温度は、37℃であることから、本発明の増幅反応中に失活していくことが考えられた。そこで、増幅反応の途中でRNase Hをさらに添加することによる増幅反応への影響を検討した。鋳型DNAは、カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター及びEPSPS遺伝子の挿入された組み換えダイズより抽出したゲノムDNAから配列表の配列番号134及び135記載のGMO-PCR-F及びGMO-PCR-Rプライマーを用いたPCRにより得られた増幅断片（1071bp）を使用した。また、配列表の配列番号136～139記載の塩基配列を有するプライマー、GMO-S1、S2、A1、A2を使用した。なお、該プライマーは、3'末端の2塩基がリボヌクレオチドである。反応は、以下のように行った。すなわち、各50pmolの上記プライマー、2 $\mu$ lの0.05%プロピレンジアミンを含むアニーリング溶液、1pg～10ngの鋳型DNA及び滅菌水で全液量10 $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液は、98℃、2分間熱変性し、55℃まで冷却し、アニーリング処



理を行った。

#### 【0237】

アニーリング処理後、上記混合溶液に 0.5 mM dNTP 混合物、42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH 8.5)、4.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% ウシ血清アルブミン、1.25% ジメチルスルホキシド、30 U の大腸菌由来 RNase H、5.5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を 50  $\mu$ l にした。該反応液は、サーマルサイクラーで 55℃ で 25 分間保持した。反応開始から 25 分後に、さらに 30 U の大腸菌由来 RNase H を添加し、55℃ で 30 分間保持した。対照として、55℃ で 55 分間保持したものも調製した。反応終了後、反応液 3  $\mu$ l を 3% アガロース電気泳動に供した。その結果、いずれの鋳型 DNA 濃度でも、いずれのプライマーの組み合わせ、S1/A1、S1/A2、S2/A1、S2/A2 においても RNase H を反応途中で加えることにより増幅効率が改善されることを確認した。

#### 【0238】

##### 実施例 25

本発明で使用する鋳型となる核酸を増幅あるいは複製する方法と、本発明の方法の組み合わせについて検討した。反応は以下のように行った。すなわち、実施例 18 (3) で調製した菊ウィロイド遺伝子を含み、大腸菌で複製したプラスミドを鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いてインビトロトランスクリプションを行い、RNA 複製断片を得た。配列表の配列番号 113 及び 114 記載の塩基配列を有するプライマー及び cDNA シンセシスキット (宝酒造社製) を用いて cDNA を合成した。該 cDNA 断片及び上記複製プラスミドを鋳型として実施例 18 (3) 記載の方法で増幅反応を行った。その結果、鋳型となる核酸をプラスミドの形で複製した場合及び RNA ポリメラーゼで RNA を複製し、cDNA にした場合のいずれにおいても本発明の方法で 사용할ことを確認した。

#### 【0239】

##### 【発明の効果】

本発明により、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するDNA合成反応により標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法が提供される。また、該標的核酸の増幅方法で得られた標的核酸の増幅断片を検出する工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法が提供される。また、本発明の増幅方法は、他の核酸増幅方法あるいは核酸複製方法と組み合わせて使用することにより、効率的な核酸配列の製造方法として利用できる。また、本発明によりウイルス、細菌、カビ、酵母などの微生物、特に病原性微生物等の高感度、特異的検出、定量のための標的核酸の検出方法及び該方法のためのキメラオリゴヌクレオチドプライマーが提供される。さらに、本発明により自動化、微量化、高集積化された核酸の増幅、検出システムが提供される。

【 0 2 4 0 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明における 1 本鎖 DNA に対する方法の一例を示すフローチャートである。図中、黒丸は遊離した DNA 鎖が (6) の鋳型 DNA であることを示す。

【図 2】 本発明の方法により種々の反応時間で増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 3】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 4】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 5】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 6】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 7】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 8】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル

電気泳動の結果を示す図である。

【図 9】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 1 0】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 1 1】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 1 2】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【 0 2 4 1 】

配列表フリーテキスト

SEQ ID No:1

Synthetic DNA corresponding to a portion of human transferrin receptor-encoding sequence used as a template

SEQ ID NO:2

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:3

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer rin receptor-encoding sequence

SEQ ID No:4

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 21 is ribonucleoti de-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:5

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin recept r-encoding sequence. "nucleotide 21 is ribonucleotid e-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:6

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 22 is ribonucleotide-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:7

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 22 is ribonucleotide-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:8

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:9

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:10

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No: 11

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:12

Designed oligonucleotide used as a probe for detecting an amplified portion of human transferrin receptor-encoding sequence

SEQ ID No: 13

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

cleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No: 14

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN t  
o amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonuc  
leotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:15

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of plasm  
id pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are  
deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:16

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower 542  
to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonuc  
leotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:17

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of plasm  
id pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are  
deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:18

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplif  
y a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 23 to 25 are ribonucleotides-  
other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:19

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN t  
o amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 23 to 25 are ribonuc  
leotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:20

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249  
to amplify a porti n of plasmid pUC19. "nucleotides 23 t 25 are ribonuc  
leotides-other nucleotides are de xyribonucle tides”

SEQ ID No: 21

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:22

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:23

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No: 24

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:25

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:26

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:27

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:28

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:29

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:30

Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:31

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:32

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19

SEQ ID No:33

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19

SEQ ID No:34

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19

SEQ ID No:35

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID N :36

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:37

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19  
SEQ ID No:38

Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19  
SEQ ID No:39

Synthetic RNA used as a probe for detecting an amplified portion of plasmid pUC19  
SEQ ID No:40

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"  
SEQ ID No:41

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"  
SEQ ID No:42

Designed oligonucleotide primer designated as M13M4  
SEQ ID No:43

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"  
SEQ ID N :44

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucle



otides 15 to 17 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:45

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:46

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:47

Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment

SEQ ID No:48

Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

SEQ ID No:49

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:50

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID N :51

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:52

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:53

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA. "nucleotides 16 to 17 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:54

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA. "nucleotides 16 to 17 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:55

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:56

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:57

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:58

Designed oligonucleotide primer designated as R1-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:59

Designed oligonucleotide primer designated as R1-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:60

Designed oligonucleotide primer designated as R2-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:61

Designed oligonucleotide primer designated as R2-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:62

Designed oligonucleotide primer designated as R3-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:63

Designed oligonucleotide primer designated as R3-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:64

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 17mer. "nucleotides 16 to 17 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:65

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:66

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene

SEQ ID No:67

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene

SEQ ID No:68

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeletal 11 keratin gene

SEQ ID No:69

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeletal 11 keratin gene

SEQ ID No:70

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:71

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:72

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:73

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID No:74

Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

SEQ ID No:75

Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

SEQ ID No:76

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 20mer.  
"nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:77

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13RV-3N 20mer.  
"nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:78

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 24mer.  
"nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

bonucleotides”

SEQ ID No:79

Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-3N 24mer. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:80

Designed oligonucleotide primer designated as 5' ID to amplify a portion of cyclin A DNA

SEQ ID No:81

Designed oligonucleotide primer designated as 3' ID to amplify a portion of cyclin A DNA

SEQ ID No:82

Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 16mer. "nucleotides 15 to 16 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:83

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:84

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:85

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:86

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human

transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-ther nucleotides are deoxyribonucle tides"

SEQ ID No:87

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:88

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:89

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:90

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:91

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:92

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No: 93

Designed chimeric olig nucleotide primer to amplify a p rtion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are rib n

ucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID N :94

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:95

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:96

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:97

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

SEQ ID No:98

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

SEQ ID No:99

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:100

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No: 101

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA.

SEQ ID No:102

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of  
Flavobacterium species DNA.

SEQ ID No:103

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:104

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:105

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding  
sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID No: 106

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding  
sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID No:107

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:108

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 18 t 20 are ribonucleotides- ther nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:109



Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:110

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID No:111

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID No:112

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:113

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID No:114

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID No:115

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:116

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No: 117

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other n

ucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:118

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:119

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:120

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 18 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:121

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:122

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID No:123

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID N :124

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of ver  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other nucl  
eotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:125

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 15 is inosine-other nucl  
eotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:126

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 9 to 11 and 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are d  
eoxyribonucleotides"

SEQ ID No:127

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 8 to 10 and 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are d  
eoxyribonucleotides"

SEQ ID No:128

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero  
toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucl  
eotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonuc  
leotides"

SEQ ID No:129

Designed oligonucleotide probe t detect a DNA fragment amplifying a po  
rtion of ver toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia col  
i 0-157.

SEQ ID No:130

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-ther nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:131

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:132

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse.

SEQ ID No:133

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse

SEQ ID No:134

Designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-F 20mer

SEQ ID No:135

Designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-R 20mer

SEQ ID No:136

Designed chimeric oligonucleotide primer designated as GMO-S1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:137

Designed oligonucleotide primer designated as GMO-S2 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:138

Designed oligonucleotide primer designated as GMO-A1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

es”

SEQ ID No:139

Designed oligonucleotide primer designated as GM0-A2 20 mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:140

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferin receptor-encoding sequence

SEQ ID No:141

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferin receptor-encoding sequence

SEQ ID No:142

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID No:143

Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

【 0 2 4 2 】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for detection of nucleic acids

<130> T-1542

<160> 143

<210> 1

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA corresponding to a portion of human transferrin receptor-encoding sequence used as a template

<400> 1

ggacagcaac tgggccagca aagttgagaa actcacttta gagaattctg ctttcccttt	60
ccttgcatat tctgagcagt ttctttctgt ttttgcgag	99

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 2

cagcaactgg gccagcaaag tt	22
--------------------------	----

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

<400> 3

gcaaaaacag aaagaaactg ct

22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 21 is ribonucleotide-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 4

cagcaactgg gccagcaaag ut

22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 21 is ribonucleotide-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 5

gcaaaaacag aaagaaactg ct

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 22 is ribonucleotide-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 6

cagcaactgg gccagcaaag tu

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of h



uman transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotide 22 is ribonucleotide- the nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 7

gcaaaaacag aaagaaactg cu

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 8

cagcaactgg gccagcaaag uu

22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 9

gcaaaaacag aaagaaactg cu

22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 10

cagcaactgg gccagcaaag tt

22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 11

gcaaaaacag aaagaaacug ct

22

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide used as a probe for detecting an amplified portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 12

tgctttccct ttccttgcat attctg

26

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper (2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 13

attgcttaat cagtgaggca cctau

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 14

gataacactg cggccaactt actuc

25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 15

actggcgaac tacttactct agcuu

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower

542 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 16

agtcaccagaa aagcatctta cggau

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 17

gctcatgaga caataaccct gataa

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 23 to 25 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 18

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtaug

25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 23 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 19

gataacactg cggccaactt acuuc

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 23 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 20

cgcctccatc cagtctatta atugu

25

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 21

ctgattgaga ggattcctga gu

22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 22

tagggagaga ggaagtgata cu

22

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper  
(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are r  
ibonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 23

attgcttaat cagtgaggca cctau

25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper  
(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are r  
ibonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 24

attgcttaat cagtgaggca cctaa

25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera



<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper (2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 25

attgcttaat cagtgaggca cctac

25

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper (2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 26

attgcttaat cagtgaggca cctag

25

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 27

ctgattgaga ggattcctga gu

22

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 28

tagggagaga ggaagtgata cu

22

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 29

gctgcaaggc gattaagttg ggua

24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 30

ctttatgctt ccggctcgta tguu

24

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 31

cgcctccatc cagtctatta attgu

25

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 32

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatg

25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 33

cgcctccatc cagtctatta attgt

25

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 34

gataacactg cggccaactt acttc

25

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 35

ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggua

30

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 36

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatguu

30

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 37

ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta

30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 38

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatggtt

30

<210> 39

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic RNA used as a probe for detecting an amplified portion of plasmid pUC19

<400> 39

ugauc(cccca uguugugcaa aaaagcgguu

30

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 40

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtaug

25

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3 t am  
plify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleoti  
des-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 41

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatguu

30

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13M4

<400> 42

gttttcccag tcacgac

17

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"



<400> 43

agttaatgtg gtggcgaa

18

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 44

gactcttcca tctgcca

17

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 45

ttcggtatcc tattcccg

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 46

tctctgggtca ttgtauaa

18

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a l  
ng DNA fragment

<400> 47

ccattcaggc tgcgcaactg tt

22

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

<400> 48

tggcacgaca ggtttcccga ct

22

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides -other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 49

gctgcaaggc gattaagttg ggua

24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides -other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 50

ctttatgctt ccggctcgta tguu

24

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 51

aacaacaaga aactggtttc

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 52

gcaatgcatg acgactgggg

20

<210> 53

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA. "nucleotides 16 to 17 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 53

gttttcccag tcacgac

17

<210> 54

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA. "nucleotides 16 to 17 are ribonucleotides--other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 54

caggaaacag ctatgac

17

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 55

gtacgggtcat catctgacac

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 56

gcaatcggca tgttaaacgc

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 57

cgccatcctg ggaagactcc

20

<210> 58

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R1-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 58

tttcacacag gaaacagcta tgacaacaac aagaaactgg tttc

44

<210> 59

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R1-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 59

tttcacacag gaaacagcta tgacgcaatg catgacgact gggg

44

<210> 60

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R2-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 60

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acaacaaca gaaactggtt 60

tc 62

<210> 61

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R2-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 61

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acgcaatgca tgacgactgg 60

gg 62

<210> 62



<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R3-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 62

cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca	60
ggaaacagct atgacaaca caagaaactg gtttc	95

<210> 63

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R3-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 63

cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca	60
ggaaacagct atgacgcaat gcatgacgac tgggg	95

<210> 64

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 17 mer. "nucleotides 16 to 17 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 64

caggaaacag ctatgac

17

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 20 mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 65

acacaggaaa cagctatgac

20

<210> 66

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related

ed protein kinase PISSLRE gene

<400> 66

gagttcgtgt ccgtacaact atttcacaca ggaaacagct atgacccaac aagagcctat 60  
agcttcgctc 70

<210> 67

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene

<400> 67

tcgaaatcag ccacagcgcc atttcacaca ggaaacagct atgacccgct gtctttgagt 60  
tgtggtg 67

<210> 68

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeletal 11 keratin gene

<400> 68

gagttcgtgt ccgtacaact atttcacaca ggaaacagct atgacgctat tctgacatca 60  
ctttccagac 70

<210> 69

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cy  
toskeletal 11 keratin gene

<400> 69

tcgaaatcag ccacagcgcc atttcacaca ggaaacagct atgacgaatt ccactggtgg 60  
cagtag 66

<210> 70

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacterioph  
age lambda DNA

<400> 70

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acgtacggtc atcatctgac 60  
ac 62

<210> 71

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 71

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acatgcgccg cctgaaccac 60  
ca 62

<210> 72

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 72

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acctgctctg ccgcttcacg 60  
ca 62

<210> 73

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 73

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acgcaatcgg catgttaaac 60  
gg 62

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

<400> 74

gctgcaaggc gattaagttg ggta 24

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify

a p r t i o n f p l a s m i d p U C 1 9 - 2 4 9 r p l a s m i d p U C 1 9 - 9 1 1

<400> 75

ctttatgctt ccggctcgta tggt

24

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 20 mer. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 76

agggttttcc cagtcacgac

20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13RV-3N 20 mer. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 77

acacaggaaa cagctatgac

20

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 24 mer. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 78

cgccagggtt ttcccgatca cgac

24

<210> 79

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-3N 24mer. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 79

tttcacacag gaaacagcta tgac

24

<210> 80



<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as 5' ID to amplify a portion of cyclin A DNA

<400> 80

tcgaaatcag ccacagcgcc atttcacaca ggaacagct atgacatgtt ttgggagaa	60
ttaagtctga	70

<210> 81

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as 3' ID to amplify a portion of cyclin A DNA

<400> 81

gagttcgtgc cgtacaacta ttccacacag gaaacagcta tgacttacag atttagtgtc	60
tctggtggg	69

<210> 82

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 16mer. "nucleotides 15 to 16 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 82

aggaaacagc tatgac

16

<210> 83

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 83

cagcaactgg gccagcaaag uugagaa

27

<210> 84

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric ligonucleotide primer t amplify a portion of h

uman transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 84

gcaaaaacag aaagaaactg cucagaa

27

<210> 85

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 85

cagcaactgg gccagcaaag uugaga

26

<210> 86

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 86

gcaaaaacag aaagaaactg cucaga

26

<210> 87

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 87

cagcaactgg gccagcaaag uugag

25

<210> 88

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 88

gcaaaaacag aaagaaactg cucag

25

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 89

cagcaactgg gccagcaaag uuga

24

<210> 90

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 90

gcaaaaacag aaagaaactg cuca

24

<210> 91

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 91

cagcaactgg gccagcaaag uug

23

<210> 92

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 92

gcaaaaacag aaagaaactg cuc

23

<210> 93

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 93

cagcaactgg gccagcaaag uu

22

<210> 94

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence. "nucleotides 21 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 94

gcaaaaacag aaagaaactg cu

22

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 95

cctttctctg ttttgtccg

20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of 1  
ambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 96

aagcacctca ttaccctugc

20

<210> 97

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

<400> 97

gggcggcgac ctgcgggtt ttcg

24

<210> 98



<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

<400> 98

gctgcttatg ctctataaag tagg

24

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of  
Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-ot  
her nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 99

aggaatcttt attaccaug

20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of  
Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-ot  
her nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 100

tggtgtttaa acttattgcg

20

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of  
Flavobacterium species DNA.

<400> 101

ccatcagcta taaacacaaa cagc

24

<210> 102

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion f  
Flavobacterium species DNA.

<400> 102

tgttttgacc aaacatagta atgc

24

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 103

tcgttaaata gtatacggac a

21

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 104

tgctcaataa tcagacgaag

20

<210> 105

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin  
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 105

aaatggggta ctgtgcctgt tact

24

<210> 106

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin  
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 106

ctctgtatct gcctgaagcg taag

24

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 107

tactgggtt tttcttcggu a

20

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 108

atagactttt cgacccaaca

20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 109

atagacatca agccctcgua

20

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin  
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 110

tcgttaaata gtatacggac a

21

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed olig nucle tide primer to amplify a portion of vero toxin

2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 111

atagacatca agccctcgta

20

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 112

gaacaatgga agtcaacaaa

20

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV d.

<400> 113

tacttgtggt tcctgtggtg

20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV  
d.

<400> 114

atactaaggt tccaagggt

20

<210> 115

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
iroid CSVd. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides  
are deoxyribonucleotides"

<400> 115

ggaaacctgg aggaaguc

18

<210> 116

<211> 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
iroid CSVd. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides  
are deoxyribonucleotides"

<400> 116

gtgaaaaccc tgtttaggau

20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of F  
lavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-oth  
er nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 117

acctagatat aagctctaca

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 118

aaatagatgt tttagcagag

20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 119

atagataaaa aaaactccac

20

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "

nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 18 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 120

tcgttaaata gtatacgiac a

21

<210> 121

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 121

tcgttaaata gtatacigac a

21

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other

nucleotides are deoxyribonucleotides”

<400> 122

tcgttaaata gtataiggac a

21

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. ”  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—nucleotide 17 is inosine—other  
nucleotides are deoxyribonucleotides”

<400> 123

tgctcaataa tcagaciaag

20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hem rrhagic Escherichia c li 0-157. ”  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—nucle tide 16 is in sine- ther  
nucleotides are deoxyribonucleotides”

<400> 124

tgctcaataa tcagaigaag

20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 15 is inosine-other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 125

tgctcaataa tcagicgaag

20

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 9 to 11 and 19 t 21 are ribonucleotides- ther nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 126

tacctggguu uttcttcggu a

21

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 8 to 10 and 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 127

atagacauca agccctcgua

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 128

gtcccctgag atatatguuc

20

<210> 129

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 129

ccaacaaagt tatgtctctt cgttaaatag

30

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of i NOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 130

atgccattga gttcatcaac

20

<210> 131

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of i  
NOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleoti  
des-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 131

tcttggtggc aaagatgag

19

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encod  
ing sequence from mouse.

<400> 132

atgccattga gttcatcaac

20

<210> 133

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse

<400> 133

tcttggtggc aaagatgag

19

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-F 20mer

<400> 134

atcggtgaag atgcctctgc

20

<210> 135

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-R 20mer

<400> 135

tccgtatgat cgcgcgcat

20

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as GM0-S1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 136

tttggagagg acacgctgac

20

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GM0-S2 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 137

ggacacgctg acaagctgac

20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GM0-A1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 138

ggctgtagcc actgatgcug

20

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GM0-A2 20 mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 139

ttccggaaag gccagaggau

20

<210> 140

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 140

caacttcaag gtttctgccg gc

22

<210> 141

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

<400> 141

aatagtcgaa gtagctagag c

21

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 142

tactgggtt tttcttcggu a

20

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

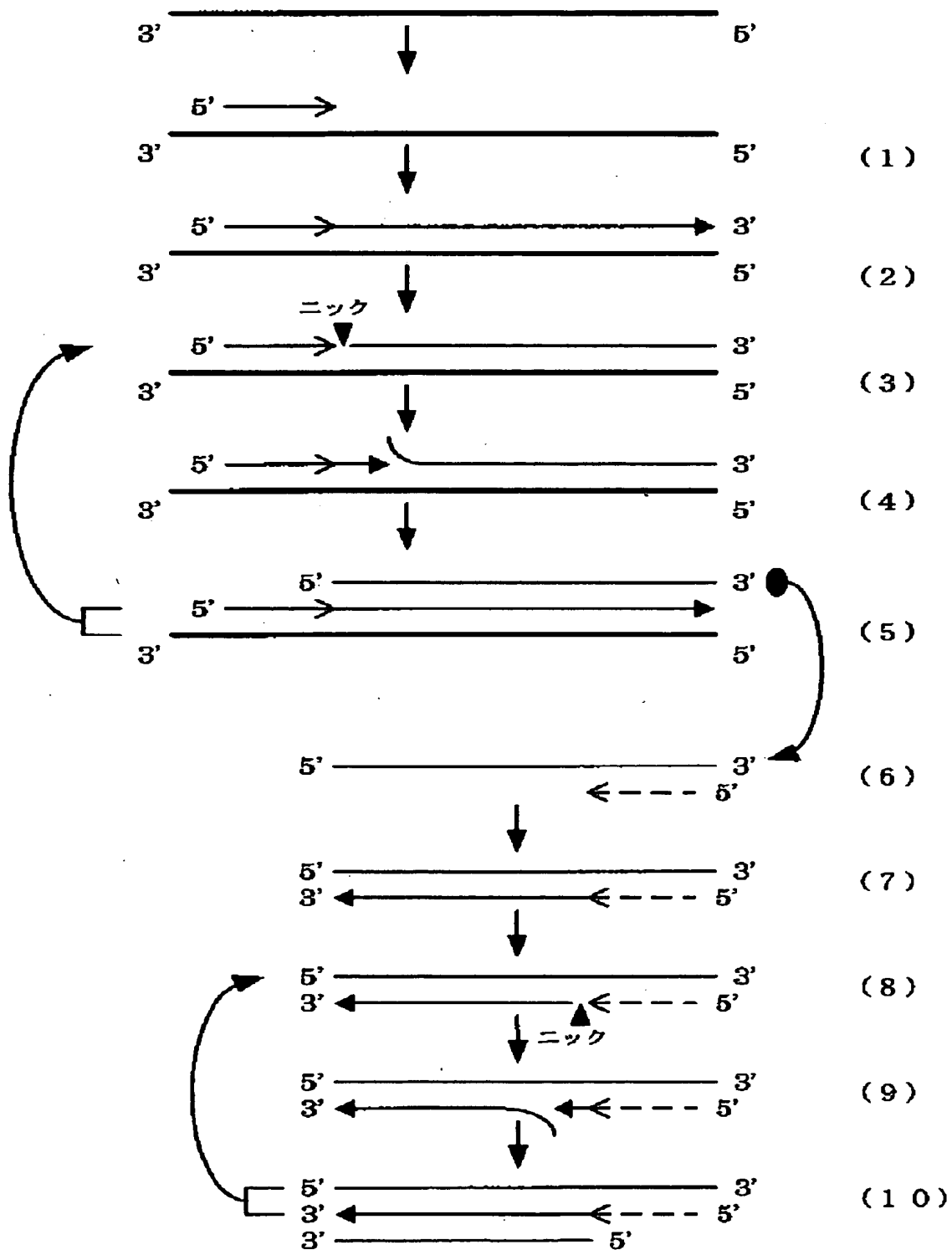
<400> 143

atagacatca agccctcgua

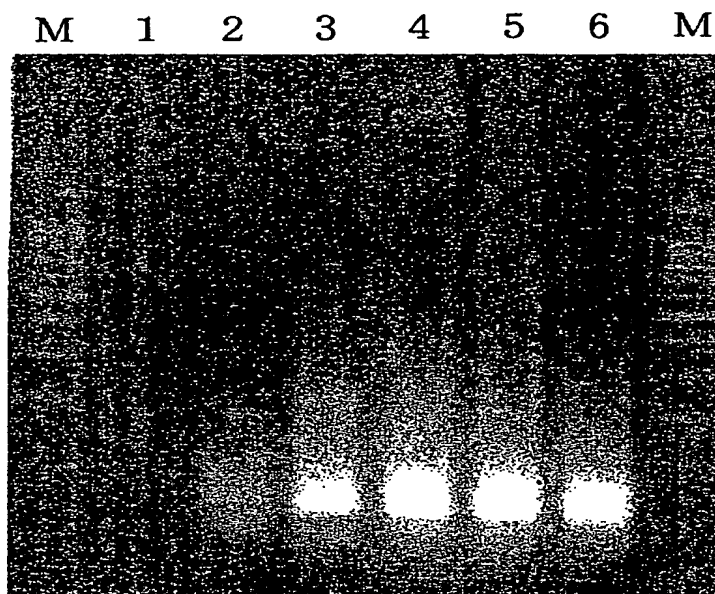
20

【書類名】 図面

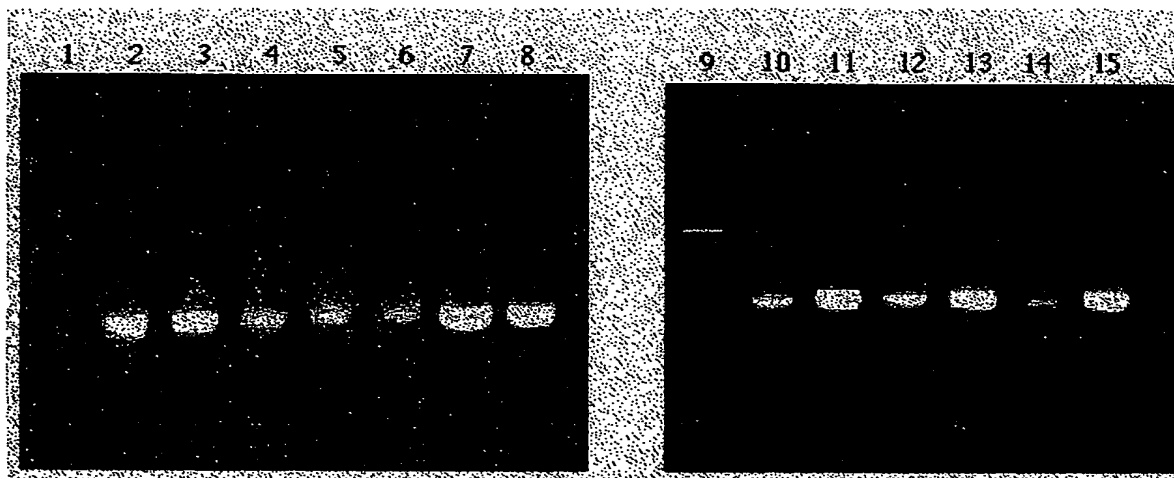
【図1】



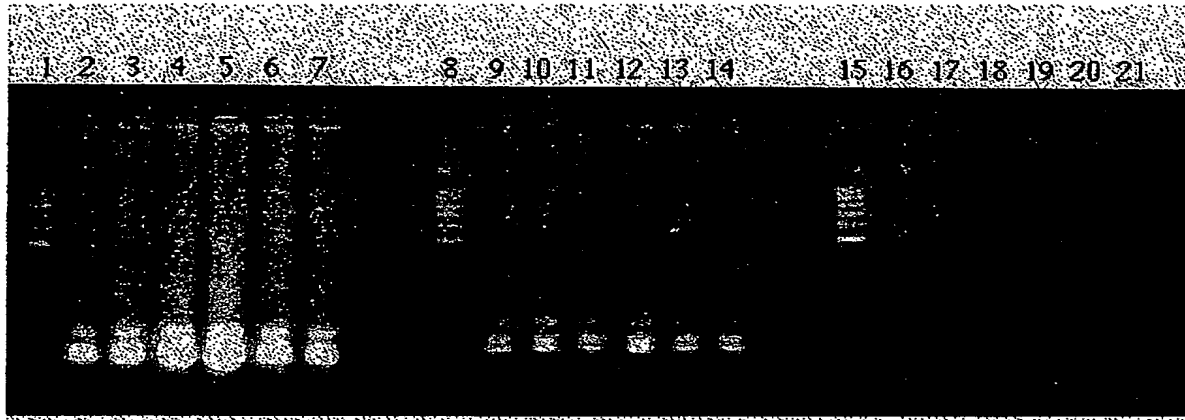
【図2】



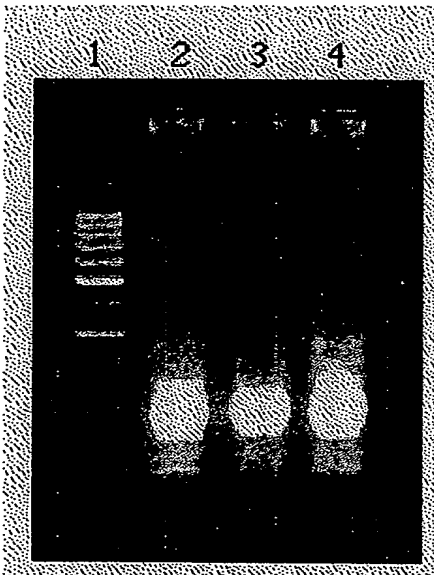
【図3】



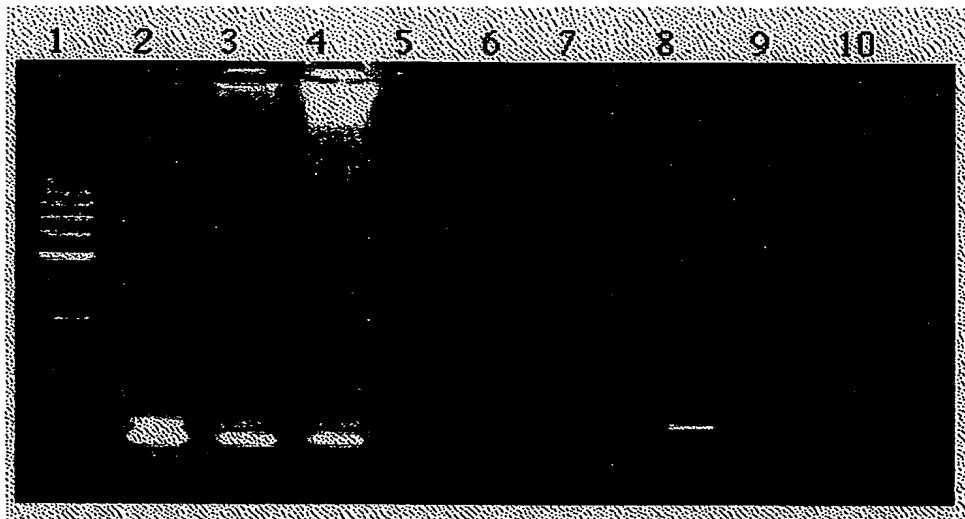
【図4】



【図5】

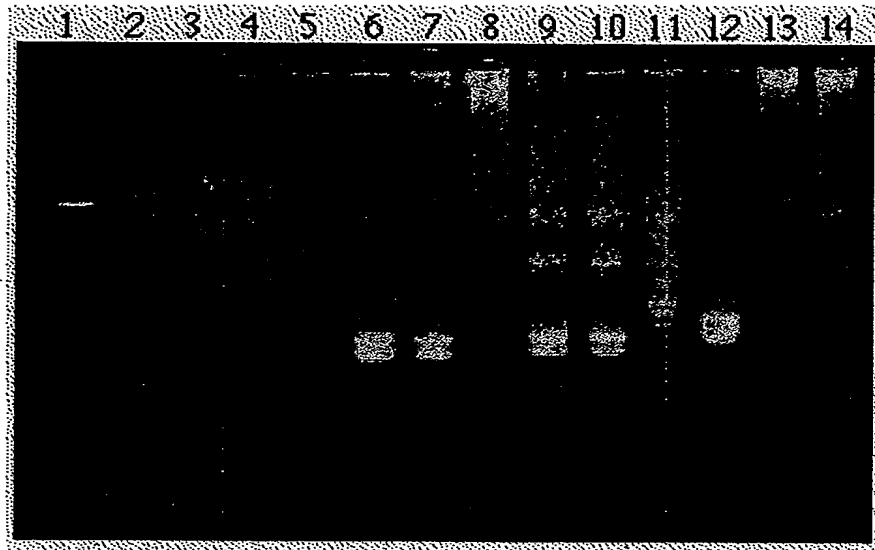


【図6】

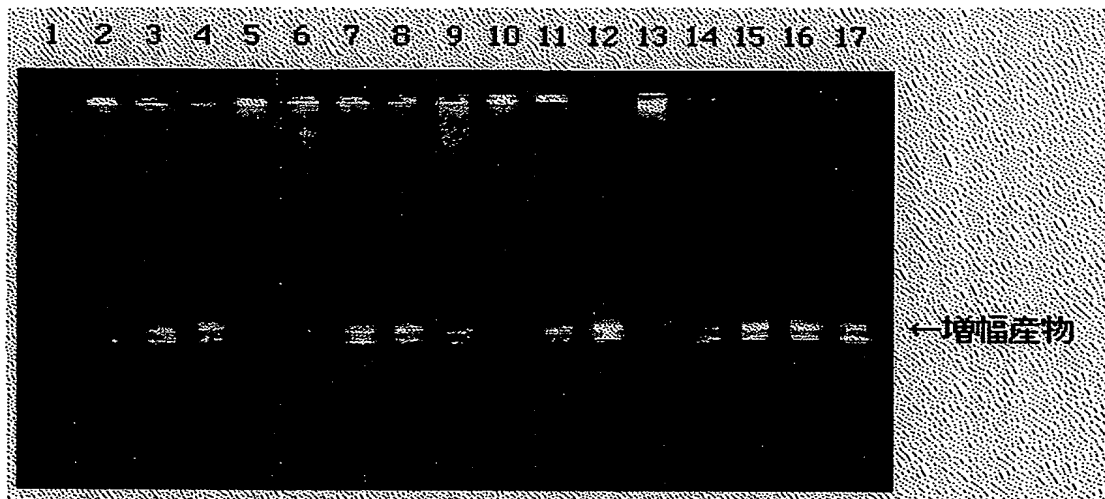




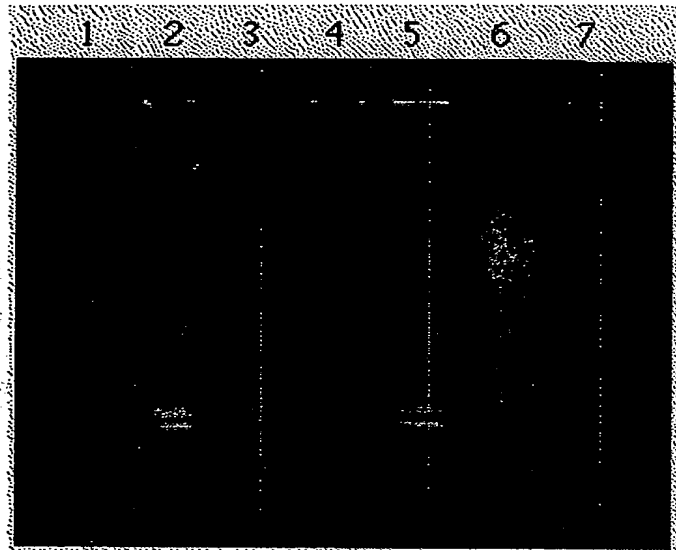
【図7】



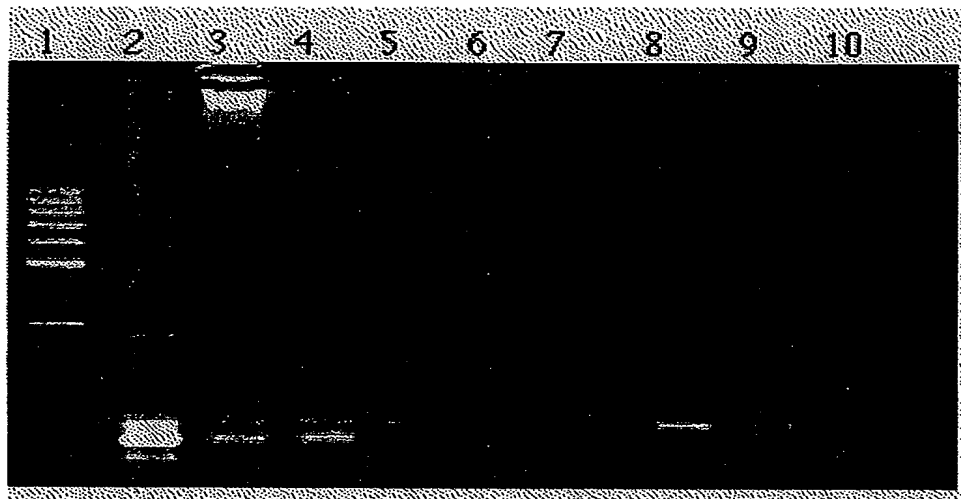
【図8】



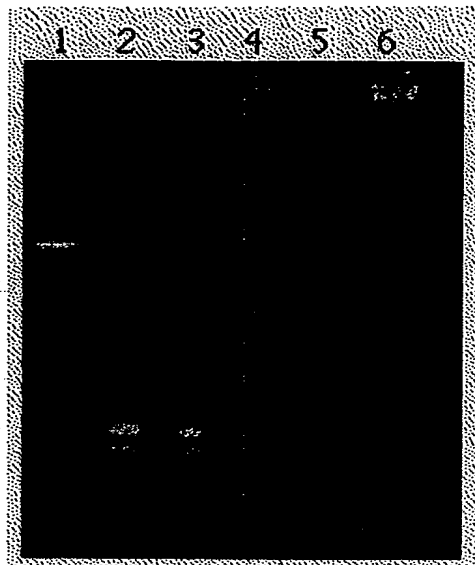
【図9】



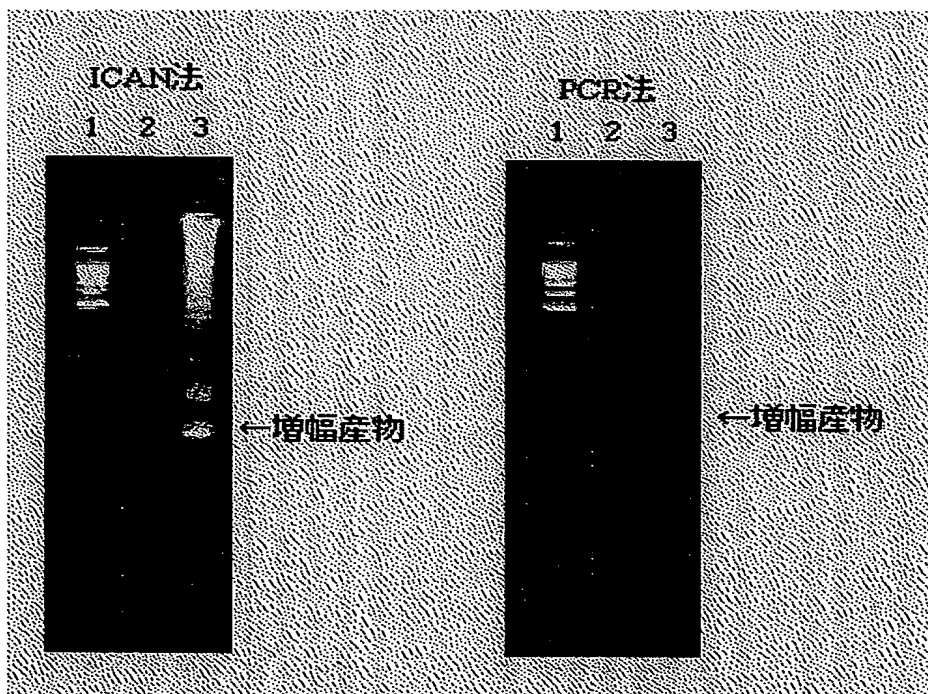
【図10】



【図11】



【図12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の標的核酸を高感度・特異的に増幅する標的核酸の増幅方法、該方法を利用した標的核酸の検出方法、該増幅方法を用いた標的核酸の製造方法及びこれらの方法に用いるプライマーを提供すること。

【解決手段】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用した試料中の標的核酸を高感度・特異的に増幅する標的核酸の増幅方法、該方法によって得られた増幅断片の検出方法、該増幅方法を用いた標的核酸の製造方法及びこれらの方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【選択図】 なし

特2000-251981

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地  
氏 名 寶酒造株式会社